

⑨ 日本国特許庁(JP)

⑩ 特許出願公開

⑫ 公開特許公報(A) 平2-122264

⑤ Int.Cl.⁵
G 01 N 33/493
33/68

識別記号 庁内整理番号
A 7055-2G
7055-2G

④ 公開 平成2年(1990)5月9日

審査請求 有 請求項の数 10 (全 29 頁)

⑬ 発明の名称 蛋白を試験するための試験具及び試験方法

⑭ 特 願 平1-246631

⑮ 出 願 平1(1989)9月25日

優先権主張 ⑯ 1988年9月30日 ⑰ 米国(US) ⑱ 251297

⑲ 発 明 者 アーサー・エル・ワ イ・ロー アメリカ合衆国、インディアナ46530、グレンジャー、バリークノール・ウェイ 17160

⑳ 出 願 人 マイルス・インコーポレーテッド アメリカ合衆国、インディアナ46515、エルクハート、ミルトル・ストリート 1127

㉑ 代 理 人 弁理士 津 国 隆 外1名

明 細 書

1. 発明の名称

蛋白を試験するための試験具及び試験方法

2. 特許請求の範囲

(1) 第一の色から第二の色への検出可能かつ測定可能な変色をすることができる第一の指示薬色素;

第一の指示薬色素とはほぼ同等なpHにおいて、第一の指示薬色素の第二の色と異なる色への検出可能かつ測定可能な変色をすることができる第二の指示薬色素; 及び

第一の色素の変色pH及び第二の色素の変色pHに十分に近似した一定のpHを維持するための適当な緩衝剤

から成ることを特徴とする、蛋白含有液体試験試料と接触した際に充分な変色を呈示して液体試験試料中の蛋白の有無及び/または濃度を示すことができる組成物。

(2) (a) 液体試料と;

第一の色から第二の色への検出可能かつ測定可

能な変色をすることができる第一の指示薬色素、

第一の指示薬色素とはほぼ同等なpHにおいて、第一の指示薬色素の第二の色と異なる色への検出可能かつ測定可能な変色をすることができる第二の指示薬色素、及び

第一の色素の変色pH及び第二の色素の変色pHに十分に近似した一定のpHを維持するための適当な緩衝剤

から成る二指示試薬組成物とを接触させ、そして

(b) 該二指示試薬組成物の変色の強さ及び/または程度から液体試料中の蛋白の有無及び/または濃度を測定すること

を特徴とする液体試料中の蛋白の有無及び/または濃度を測定する方法。

(3) 支持細片;

試薬試験パッド; 及び

該試薬試験パッドに組み込んだ二指示試薬組成物

から成り、該二指示試薬組成物が

第一の色から第二の色への検出可能かつ測定可

特開平 2-122264(2)

能な変色をすることができる第一の指示薬色素；

第一の指示薬色素とほぼ同等なpHにおいて、第一の指示薬色素の第二の色と異なる色への検出可能かつ測定可能な変色をすることができる第二の指示薬色素；及び

第一の色素の変色pH及び第二の色素の変色pHに十分に近似した一定のpHを維持するための適当な緩衝剤

から成ることを特徴とする、液体試験試料中の蛋白の有無及び／または濃度を測定するための被検体試験具。

(4) (a) 液体試料と；

第一の色から第二の色への検出可能かつ測定可能な変色をすることができる第一の指示薬色素、

第一の指示薬色素とほぼ同等なpHにおいて、第一の指示薬色素の第二の色と異なる色への検出可能かつ測定可能な変色をすることができる第二の指示薬色素、及び

第一の色素の変色pH及び第二の色素の変色pHに十分に近似した一定のpHを維持するための適当な

3

から成ることを特徴とする、液体中の蛋白の存在を感知するための試験細片。

(7) 除去可能な液状ビヒクル中に分散した重合性ウレタン化合物の層から成形した蛋白透過性の層（該液状ビヒクルの相当な部分は、分散した層状の該ウレタン化合物が重合する間に除去）；及び

重合物質の該層中に均一に組み込まれた蛋白試験組成物

から成ることを特徴とする、生物学的流体中の蛋白の相対濃度を測定するための物品。

(8) 除去可能な液状ビヒクル中に分散した完全には硬化していない重合性物質中に所定の量の試験組成物を混合させて試験含有マトリックス材を成形し；

該試験含有マトリックス材を層状に成形し；そして

該液状ビヒクルを除去しながら該層を乾燥させて該重合性物質を重合し、蛋白に対して透過性であり該所定の蛋白が乾燥したマトリックス材層に

5

緩衝剤

から成る二指示試験組成物とを接触させ、そして

(b) 該二指示試験組成物の変色の強さ及び／または程度から液体試料中の蛋白の有無及び／または濃度を測定すること

を特徴とする液体試料中の少量から痕跡量の蛋白を検出及び測定する方法。

(5) 液状ビヒクル中に分散した重合性ウレタン化合物から重合され、試験流体中の蛋白と反応することができる二指示試験組成物の中に均一に組み込んで成るマトリックス層を含んで構成され、該反応が該マトリックスにおける検出可能な変化を発生させる反応であり、該マトリックスが該蛋白に対して透過性である試験流体中の蛋白の相対濃度を検出するための試験具。

(6) 液状で担持され、ウレタン含有物質中に均一に組み込まれた二指示試験組成物を含み、該二指示試験組成物が蛋白と反応して該ウレタン含有物質において検出可能な変色を起こすことができるウレタン含有重合性物質

4

浸透する際に該蛋白と反応することができる試験組成物を含有する乾燥したマトリックス材層を成形すること

を特徴とする試験流体中の蛋白の有無を決定するための試験具の製法。

(9) 除去可能な液状ビヒクル中に分散した完全には硬化していない重合性物質の層を成形し；

該液状ビヒクルを除去しながら該層を乾燥させて該重合性物質を重合し、蛋白が乾燥したマトリックス材層に浸透する際に該蛋白と反応することができる試験組成物に対して透過性である乾燥したマトリックス材層を成形し；

該乾燥したマトリックス材層と該試験組成物とを接触させて、該乾燥したマトリックス材層に該試験組成物を均一に含浸させ；

試験組成物を含浸した該マトリックス材層を乾燥させ；

試験組成物を含浸した該マトリックス材層の表面と該試験流体とを接触させて、該マトリックス材層において視覚的に検出可能な変色を起こさ

6

特開平 2-122264(3)

せ；そして

該変色の程度に基づいて該蛋白の濃度を測定すること

を特徴とする試験流体中の蛋白濃度の測定法。

(10)重合性ウレタン化合物を除去可能な液状ビヒクル中に分散させて、完全には硬化していない重合性の層を形成する組成物を成形し；

完全には硬化していない該膜の組成物の層を支持体の表面に塗布し；

該ウレタン化合物を層状に重合させ、分散した層状の該ウレタン化合物の重合の間に液状ビヒクルの相当な部分を除去して、ベンス・ジョーンズ蛋白に対して透過性である重合ウレタンを基材としたポリマーの硬化連続層を成形すること
を特徴とする、生物学的流体において見られるアルブミン及びその他の高分子量蛋白を選別・排除しつつベンス・ジョーンズ蛋白に対して透過性であるウレタンを基材としたポリマーの連続層を含む試験具の製法。

7

片、膜または層から成るキャリアマトリックスに組み込んだ二指示試薬の使用に関する。

発明の背景及び先行技術

アルブミンは、もっとも豊富な血しょう蛋白であり、一般的には乳類の血しょう中の総蛋白の半分をわずかに越える部分を構成している。人体中では、アルブミンは、血液と組織間の水分バランスを調整し、そして、ビリルビン、脂肪酸、コレステロール及びチロキシンなど様々な化合物、ならびに、スルホンアミド及びバルビツール酸誘導体などほとんど水溶性を持たない薬剤の運搬分子として機能する重要な役割を有する。アルブミンの欠乏は、ほとんど水溶性を有しない物質の体内での運搬を制限し、この障害は、しょう液の異常蓄積、すなわち水腫により個体内で示される。したがって、個体が血清アルブミンの欠乏を有するかどうかを決定することが臨床重要である。

同様に、個体が過剰な量の蛋白を排泄しているかどうかを決定することも、臨床重要である。正常に機能している腎臓は、本質的に二段階の工

9

3. 発明の詳細な説明

発明の分野

本発明は、蛋白質の有無及び濃度について試験試料を試験する装置及び方法に関する。特に本発明は、反応体組成物として二指示試薬を有する装置を使用することにより、尿などの液体を蛋白について試験するための新規で改良された方法及び装置に関する。二指示試薬組成物は、該二指示試薬組成物が蛋白含有試験試料と接触すると、検出可能及び／または測定可能な反応が起きるように、キャリアマトリックスに組み込まれている。二指示試薬組成物により色の分解度が改良され蛋白質に対する感度が増大し、その結果、液体試験試料の蛋白含有量を、視覚によるか、あるいは機器を用いるかのいずれかにより、より正確に検出及び／または測定できるようになる。さらに本発明は、試験試料中のベンス・ジョーンズ蛋白のような低分子蛋白の有無及び／または濃度を乾式の試験細片検定手法により測定する方法における、重合ウレタン含有組成物の蛋白透過性の細

8

程で尿を生成する。血液は、腎臓の糸球体、すなわち球状の箇所を通過する。糸球体の毛細管壁は、水及び血しょうの低分子成分に対して高度に透過性である。アルブミン及びその他の高分子蛋白はこの毛細管壁を通過することができず、本質的に尿から濾過して除かれるため、これにより蛋白が人体によって利用できるようになる。低分子成分を含有する液体は、低分子蛋白などの尿成分の再吸収、尿のその他の成分の分泌及び尿の濃縮が行なわれる腎臓の細管、すなわち管状の箇所を通過する。その結果、糸球体と細管の合わさった工程を通じての尿中の蛋白の濃縮は、存在するとしても最低限のほうである。したがって、異常に高い量の尿中のアルブミン及び／または低分子蛋白を検出し、これを生理学的機能障害に関連づけなければならない。

個体の尿中にある比較的高濃度のアルブミンは、通常、疾病状態を示している。例えば、尿中の蛋白の平均的な正常濃度は、約2 mg/dL から8 mg/dL の間で変動し、このとき総尿蛋白のおよ

10

特開平 2-122264(4)

その3分の1が血清アルブミンである。しかし、疾病状態の大多数においては、尿蛋白の値は相当増加し、排泄された蛋白質の約60%~90%をアルブミンが占めるほどになる。尿中の蛋白量が異常に増加した状態は、蛋白尿として知られ、腎疾患の最も示唆的な兆候の一つであり、その他様々な非腎臓関連の疾病を表わしている場合もある。

したがって、個体がアルブミンを欠乏しているか否かを決定し、そして/または、個体が過剰な量の蛋白を排泄しているか否かを決定するため、さらに、治療の経過を観察してその効能を測定するために、簡単に正確で廉価な蛋白検出試験法が開発されてきた。さらに、尿及び血清中の蛋白の検出及び/または測定用に開発されたいくつかの試験方法の中で、色素結合法に基づいた方法が、自動化するのが容易で、再現性があり正確な結果を提供するという理由から、特に有用であることが分かっている。

一般的に、色素結合法は、アルブミンなどの蛋白と相互作用することができ、蛋白と相互作用を

1 1

には、いくつかの問題点及び不利な点がなお存在する。例えば、pH指示薬色素に基づいた方法は、約15mg/dL以下の蛋白を検出することも、約15mg/dL以下の濃度間を定量的に識別することもできない。さらに、試験試料中の蛋白総含有量の測定について簡易な半定量試験及び複雑な定量試験がそれぞれいくつか利用できるが、これらの試験方法の大部分は、簡易測定試験試験細片は記すべき例外としても、蛋白の定量を行なうために蛋白の沈殿を必要とする。

測定試験試験細片は、蛋白が特定の酸塩基指示薬と相互作用し、pHに変化がなければ、指示薬を変色させる前述した蛋白の能力を利用する。例えば、指示薬であるテトラブロモフェノールブルーが約3のpHを一定に維持するように緩衝される場合、指示薬は、蛋白を含まない溶液を黄色く変色させる。しかし、蛋白を含む溶液については、蛋白の存在のために、緩衝された色素が溶液を、溶液中の蛋白の濃度に依存して、緑または青のいずれかに変色させる。

1 3

起こすと、pHに変化がなければ、変色することができるpH指示薬色素を利用する。pH指示薬色素が蛋白と相互作用する、または蛋白に結合すると、視覚的に判断することができる指示薬色素のpKa（酸解離定数）が変更され、色素は変色を起こし、いわゆる「蛋白誤差」現象を発生する。色素結合法を用いる方法においては、pHの相当な変動によるpH指示薬色素の変色を防ぐために、適当な緩衝剤がpH指示薬色素を一定のpHに維持する。pH指示薬色素は、蛋白と相互作用を起こすと、「蛋白誤差」現象によりpHの変化が原因で発生する変色に等しい遷移を起こす。蛋白の乾式試験で使用され、蛋白と相互作用する、または蛋白に結合し、「蛋白誤差」による変色を呈示することができるpH指示薬色素の例には、テトラブロモフェノールブルー及びテトラクロロフェノール-3,4,5,6-テトラブロモスルホフタレインがある。

pH指示薬色素は蛋白試験において幅広く使用されてきたが、指示薬色素を利用する蛋白試験方法

1 2

蛋白試験で使用される測定試験細片には、緩衝されたpH指示薬色素、例えばテトラブロモフェノールブルーを含浸させたキャリアマトリックスの小型で方形のパッドから成る単一の試験領域を有するものがある。その他の測定試験細片としては、上述のとおり蛋白試験用に一つの試験領域を有し、さらにその他の尿成分の試験を同時に行えるよういくつか追加の試験領域を同細片上に有する複式測定試験細片がある。双方の形式の測定試験細片の場合、尿中の蛋白の試験は、単に測定試験細片をよく混合し遠心分離していない尿に浸し、試験細片の試験領域で得られる色を測定試験細片の瓶に貼付した基準色チャートと比較して、実施される。

pH3に緩衝化したテトラブロモフェノールブルーを指示薬色素として利用する試験細片の場合、蛋白の半定量試験を実施すると、結果は「陰性」、「微量」または「プラス」1〜「プラス」4として報告される。「陰性」の読取り値、すなわち黄色は、指示薬色素の変色がないこ

1 4

特開平 2-122264(5)

とから示されるように、尿が蛋白を含まないことを示す。“微量”の読取り値は、約5mg/dL～20mg/dLの尿中蛋白を示す。“「プラス」1”から“「プラス」4”の読取り値は、緑色から濃暗青色へと漸増的に色が推移することによって示され、それぞれ30、100、300及び2000mg/dL以上の尿蛋白濃度にほぼ相当し、数値につれて悪化する蛋白尿の指標として信頼できるものである。

前述の方法によると、尿試料中の蛋白含有量が0mg/dLから約30mg/dLの範囲にあると容易に目で測定できる。しかし、現在市販されている試験細片による色の識別方法では、0mg/dLから約15mg/dLの尿中蛋白含有量を正確に測定するには不十分である。低濃度の蛋白を検出し、その濃度を識別することができないということは、健康な人間の尿蛋白値が約10mg/dLから20mg/dLの範囲内にあることから、臨床上重大である。したがって、個体の尿蛋白含有量をより正確に認識することが、約30mg/dL未満の数値で蛋白含有量を単に推定するよりも、臨床上重要であるかもしれない。

15

座の試験結果を出すことができる。さらに、試験細片による方法は、低値の尿中蛋白そして／または患者が受けている治療の成否を正確に観察するために患者自身が家庭で実施することもできる。

以下、より詳細に説明するとおり、本発明の方法により、二指示試薬組成物を含有する試験細片を利用することによって、迅速かつ正確で信頼性が高い尿の蛋白試験が可能になる。二指示試薬組成物は目視による色の分解度、したがって試験の感度を改善し、それにより、尿蛋白濃度を約30mg/dLまたはそれ以下の値で正確に測定することができる。さらに、本発明の方法は、試験試料中の低分子蛋白、例えばベンス・ジョーンズ蛋白の有無及び／または濃度を測定するのに用いることもできる。先行技術による試験法はすべて、時間がかかり過ぎ比較的費用が大きく、患者が尿中の低分子蛋白を検出するため家庭で使用するには適さない免疫電気泳動法または加熱試験法を用いている。

ベンス・ジョーンズ蛋白は、約20,000の低分子

17

い。

当然ながら、尿試料の蛋白含有量は、半定量蛋白沈殿法または定量24時間蛋白沈殿法により、より正確に測定できる。しかし、これらの試験は時間がかかり過ぎ、比較的費用も大きい。さらに、沈殿試験は訓練された担当員により実験室内で実施されねばならず、したがって、患者が尿蛋白含有量を即座に測定し、特定の治療の成否を観察するために家庭で行なうには利用できない。

したがって、蛋白値を0mg/dL～約10mg/dL、約10mg/dL～20mg/dL、約20mg/dL～30mg/dL、及びそれ以上約100mg/dL～300mg/dLの間の範囲で視覚的に識別することが可能である蛋白含有量について尿を試験するための簡易かつ正確で、信頼性が高い方法を有することは極めて有利であろう。含浸／読取り試験細片など使用が容易な形態で尿蛋白濃度を測定するような正確な方法を提供することで、尿試験は、試験結果が出るまで一日も待つことなく診断が行なえ、治療がただちに開始されるべく、実験担当員の手で実施され即

16

量を持し腎臓の糸球体フィルターを透過できるほど小さな尿中蛋白の一群に属する。しかし、ベンス・ジョーンズ蛋白は通常、腎臓の腎状部で再吸収される。したがって、ベンス・ジョーンズ蛋白の濃度は、健康な人間の尿においては無視できる程度である。そのため、尿中に有意量のベンス・ジョーンズ蛋白が存在する場合は、通常臨床的に重大である。総体的に、尿中の低分子蛋白の検出及び測定は、ある種の疾病の特徴が、高アルブミン値レベルが特徴である慢性蛋白尿というよりも、特定の低分子蛋白（グロブリン）の排泄であることから、重要である。

例えば、ベンス・ジョーンズ蛋白は高分子骨髓腫血しょうグロブリンの一部を被われ、したがって、骨髓腫または白血病患者の半数以上の尿中で増量して見られる。ベンス・ジョーンズ蛋白尿もまた、多くのマクログロブリン血症及び原発性全身性アミロイドーシス患者の尿中で見られる。さらに、ベンス・ジョーンズ蛋白に類似した特定のグロブリンの排泄の増加がフランクリン病にお

18

特開平 2-122264(6)

いて発生する。そして、腎尿細管障害、例えばファンconi症候群の患者は、尿中に排泄されるグロブリンの量において相当な増加を示す。したがって、研究者たちは、市販の試験細片において用いる色素結合法が低分子蛋白、例えばベンス・ジョーンズ蛋白に対して鈍感であることから、低分子蛋白用の簡易試験法を探究してきた。驚くべきことであり、また思い掛けないことであるが、本発明の方法は、ベンス・ジョーンズ蛋白などの低分子蛋白の濃度を、適当なサイズの気孔を有する重合ウレタン含有のフィルム、層または膜に組み込んだ二指示試薬組成物を用いて、検出及び測定する技術を提供する。

ベンス・ジョーンズ蛋白は、約45℃～60℃の間の温度に加熱すると凝集し、その後さらに試験試料の沸点にまで加熱すると再溶解するという点で、その他すべての尿蛋白とは異なる。ベンス・ジョーンズ蛋白のこの特異な性質は、該蛋白についてのすべての定性及び半定量測定の基準であった。市販の試験細片において使用する色素結合法

1 9

せるに十分なだけの気孔のサイズを有する。

異常に高いアルブミン値または低分子蛋白の存在のいずれかの結果である蛋白尿は、臨床上及び病理学上の障害の正確な性質ならびに特定の疾病の程度に依存する。蛋白尿は、断続的または継続的に現れ、一時的で断続的な蛋白尿は、腎臓障害よりむしろ、通常は生理的または機能的状態により発生する。したがって、尿及びその他蛋白についての試験試料の正確で完全な分析は、実験室及び家庭での使用の双方について利用できない。このような試験は、正しい診断が下され、正しい治療が実施、観察そして維持されるべく、対象の蛋白、つまりアルブミン及び／またはベンス・ジョーンズ蛋白の検出及び測定が可能でなければならない。さらに、アルブミンのような高分子蛋白及びベンス・ジョーンズ蛋白のような低分子蛋白の双方についての蛋白試験方法が、尿またはその他の試験試料中の蛋白の容易で廉価な定性及び／または半定量測定のために浸漬／脱取りの形態で利用できるなら、好都合といえるだろ

2 1

は、健康な個体の尿中にあるより高分子量の蛋白、例えばアルブミンのはるかに高い相対濃度がベンス・ジョーンズ蛋白の存在の障害となり、それを遮蔽する効果を有する理由から、該蛋白に対しては感受性がないことが分かっている。そのうえ、ベンス・ジョーンズ蛋白からアルブミンを分離させることは不都合で費用がかかり、乾式試験細片を使用する前に該蛋白からアルブミンを分離させる利点が無になる。

このため、乾式試験細片は、尿中のベンス・ジョーンズ蛋白の有無及び濃度についての試験には、目下のところ利用できない。しかし、本発明の高感度な二指示試薬組成物を十分に微小なサイズの気孔を有するキャリアマトリックスに組み込むことで、尿試料中に含有されているアルブミンがキャリアマトリックスに浸透し、二指示試薬組成物と相互作用して変色を起こさせることがなくなる。しかし、キャリアマトリックスは、ベンス・ジョーンズ蛋白が該マトリックスに浸透し、二指示試薬組成物と相互作用して変色さ

2 0

う。

そのうえ、尿またはその他の試験試料中の蛋白を試験するいかなる方法も、競合する化学的または物理的相互作用、例えばpH変化または蛋白以外の試験試料の成分との優先的相互作用の結果としてでなく、蛋白との相互作用の結果として変色を受ける組成物を利用することにより、正確で信頼でき再現性のある結果を出さなければならない。さらに、蛋白試験方法が、尿またはその他の試験試料中の蛋白の即座で低廉そして正確な測定のために湿式試験及び乾式試験細片の両方に適するなら、好都合といえるだろう。またそのうえに、蛋白試験において利用される方法及び組成物は、複式試験パッド細片上にある他の試験試薬パッドに有害に作用したり、またはそれに対して障害となつてはならない。

本発明以前には、試験の色分解度を改善し比較的低い蛋白濃度値での試験の感度を増大する二指示試薬組成物を特徴とし、それにより約30mg/dL及びそれ以下の蛋白濃度について正確で信頼でき

2 2

特開平 2-122264(7)

る蛋白試験を実施することができる。尿及びその他の試験試料を蛋白について試験する公知の方法は存在しない。さらに、単一の色素、例えばテトラブロモフェノールブルーまたはテトラクロロフェノール-3,4,5,6-テトラブロモスルホンフタレインを用いる乾式化学試験細片は、何年かにわたって広範囲に使用されてきたが、比較的低い蛋白濃度値での視覚による色分解度を改善し、したがって感度を増大するために二色素を組み込んだ乾式試験細片はこれまでに存在していない。そのうえ、本発明の方法までは、乾式試験細片による手法は、主として、総蛋白濃度、すなわちアルブミンに対しては利用することはできた。しかし、驚くべきことであり、思い掛けないことには、本発明の方法により、ペンス・ジョーンズ蛋白などの低分子蛋白についての尿及びその他の試験試料の乾式試験細片試験が可能である。

先行技術は、蛋白について尿を試験するpH指示薬色素方法において用いられる湿式及び乾式化学に關しての数多くの言及を含む。例えば、Keston

2 3

を利用することにより、低分子蛋白を含む蛋白についての尿及びその他の試験試料の乾相試験細片試験及び湿式試験において、新規で思い掛けない結果が達成される。

発明の概要

要約すると、本発明は、新規で改良された試験装置、その試験装置の製法及び試験試料中の成分の有無及び／または濃度の測定方法に關する。本装置は、試験試料の成分と相互作用して検出可能な応答をなすことが可能な反応体組成物を組み込んだキャリヤマトリックスを特徴とする。家庭での使用の場合、反応体組成物は視覚的に検出可能な応答をなす。実験室での使用の場合、反応体組成物は、視覚及び機器により検出可能な応答をなす。本発明の装置のキャリヤマトリックスは、濾紙のような吸水性の多孔性材質または重合性ウレタン含有材質の新規で改良された非吸水性で蛋白透過性の細片、層または膜から成る。反応体組成物は、マトリックスが完全に硬化する前またはその後で、重合性キャリヤマトリックス

2 5

の米国特許第3,485,587号は、一定pH値における蛋白の試験で使用される基本的な色素結合法を開示している。Kestonは、色素の変色を観察することでアルブミンの有無及び／または濃度を測定するために、色素のpKa（酸解離定数）よりわずかに低い一定pH値に維持した単一の指示薬色素を用いることを述べている。

先行技術そして現在市販で入手できる試験細片と対照的に、本発明の方法は、指示薬色素の組み合わせを用いることにより、尿中蛋白の検出及び測定における感度を増大し、それにより約30mg/dL及びそれ以下の正確な蛋白値測定を可能にする。思い掛けなく、そして驚くべきことに、本発明の方法により、低い値のペンス・ジョーンズ蛋白の簡易で本質的に即座の検出及び測定が可能である。これは、尿試料中の比較的高濃度のアルブミンによる干渉が原因でこれまでのところ不可能であった方法である。したがって、本発明の方法によると、適当な気孔サイズを有するキャリヤマトリックスに組み込んだ二指示試薬組成物

2 4

に均質に組み込むことが可能で、キャリヤマトリックスはその後、キャリヤマトリックスが完全に硬化した後に、所定の成分に対してのキャリヤマトリックスの透過性を維持しながらも、反応体組成物をキャリヤマトリックス全体に亘って所定の濃度において均一に保持する。

より詳細には、本発明は、新規で改良された二指示試薬組成物を用いることにより、尿またはその他の試験試料を蛋白について試験する方法に關する。ほぼ同じpH範囲で変色作用を受けることが可能な指示薬色素の組み合わせを用いることにより、色の分解度が改良され、低蛋白濃度の範囲での感度が増大されることが実証された。本発明の重要な特徴によると、尿及びその他の試験試料中の0mg/dLから約2000mg/dL、特に0mg/dLから約30mg/dLの間の蛋白値の定性及び／または半定量測定が達成される。本発明の二指示試薬組成物を臨床試験方法において利用すると、色素の組み合わせにより改良された色の分解度が、低蛋白濃度に対するこの方法の感度を増大することから、

2 6

特開平 2-122264(8)

尿またはその他の試験試料中のアルブミンなどの蛋白の定性及び／または半定量濃度をより正確に測定することが可能である。そのうえ、驚くべきことであり、また思い掛けないことであるが、ポリウレタンが基材の新規で改良されたキャリアマトリックスから成る試験装置に組み込まれた二指示試薬組成物により、尿またはその他の試験試料中の低分子蛋白、例えばベンス・ジョーンズ蛋白の検出及び測定が可能である。

したがって、液体中の化合物の相対濃度を測定するための新規で改良された方法及び試験装置を提供することは、本発明の一目的である。

本発明のもう一つの目的は、蛋白について尿またはその他の試験試料を試験する簡易で信頼性が高く正確で再現性のある方法を提供することである。

本発明のその他の目的は、試験液体中の蛋白と相互作用を起こして、該試験液体中の蛋白濃度を示す試験装置の視覚的な変化、例えば変色を起こす新規で改良された蛋白相互作用性の試験装置を

27

と蛋白と相互作用し検出可能で測定可能な変色を受け、試験試料中の蛋白の有無及び濃度を確認することが可能な二指示試薬組成物を用いることにより、尿またはその他の試験液を試験する方法を提供することである。

本発明のその他の目的は、適宜に緩衝化されると蛋白と相互作用し視覚及び／または機器により識別可能な変色を受け、0 mg/dL から約2000mg/dL、特に0 mg/dL から約30mg/dL の値の尿またはその他の液体試料中の蛋白濃度を半定量的に測定することが可能な二指示試薬組成物を提供することである。

本発明のその他の目的は、低分子蛋白の有無及び濃度について尿またはその他の試験試料を試験する方法を提供することである。

さらに、本発明のその他の目的は、二指示試薬組成物を用いることにより、ベンス・ジョーンズ蛋白などの低分子蛋白について液体試料を試験する方法を提供することである。

本発明のその他の目的は、ベンス・ジョーンズ

29

提供することである。

本発明のその他の目的は、アルブミンまたは低分子蛋白、例えばベンス・ジョーンズ蛋白について尿またはその他の試験試料を試験する方法を提供することである。

本発明のその他の目的は、目視による色の分解度を改良し、低濃度の蛋白に対する感度を増大する、尿またはその他の試験試料を試験する方法を提供することである。

さらに、本発明のその他の目的は、約15mg/dL未満の蛋白濃度を感知し、0 mg/dL から約2000mg/dL、特に0 mg/dL から約30mg/dL の間の蛋白値を半定量的に識別する、尿またはその他の液体試験試料を試験する方法を提供することである。

本発明のその他の目的は、二指示試薬組成物を用いる尿またはその他の試験液を試験する方法を提供することである。

本発明のその他の目的は、組成物の指示薬成分の変色pHよりわずかに低いpH範囲で緩衝化される

28

蛋白などの低分子蛋白は透過できるが、アルブミンなどのより高分子の蛋白は透過することができない程度の多孔度を有するキャリアマトリックスから成る乾式検出装置に二指示試薬組成物を組み込むことにより、ベンス・ジョーンズ蛋白について試験を行なう方法を提供することである。

本発明のその他の目的は、適当な多孔度のキャリアマトリックスに組み込まれた二指示試薬組成物から成る低分子蛋白の検出装置の製法を提供することである。

本発明のその他の目的は、新規で改良された試験装置、及び製造の間に、試験試料中の化合物と相互作用することが可能な反応体組成物の中に組み込んだキャリアマトリックスを含み、該キャリアマトリックスが重合性ウレタン含有組成物から成る該試験装置の製法を提供することである。

本発明のその他の目的は、硬化前には二指示薬反応体組成物と比較的均質に混在することが可能で、硬化後は低分子蛋白に対して透過性である重

30

特開平 2-122264(9)

合性ウレタン含有組成物を含むキャリアマトリックスから成る試験細片を提供することである。

本発明のその他の目的は、化合物が、ポリマーを基材としたキャリアマトリックスを透過することができ、製造中にキャリアマトリックスが完全に硬化する前及びキャリアマトリックスが完全に硬化した後で、該キャリアマトリックスに組み込まれた二指示試験組成物と反応することができる、新規で改良された試験装置及び液体中の該化合物の存在を感知するための該試験装置の製法を提供することである。

さらに、本発明のさらなる目的は、蛋白応答において新規で思い掛けない精度を有する試験細片を得るために、製造の間またはその後に二指示試験組成物をキャリアマトリックスに組み込むことが可能な新規で改良された乾式試験細片を提供することである。

本発明のその他の目的は、試験媒質中の所定の蛋白成分と相互作用することができ、試験媒質の

3 1

れる。適当な指示薬色素の組み合わせを用いることにより、単一の指示薬色素を用いる試験について目視による色の分解度が改良され、低濃度値の蛋白に対する試験の感度が増大する。本発明の方法によりもたらされる色の分解度の改良及び低蛋白値に対する感度の増大は、尿試験において特に有用である。

現在ある市販の方法によれば、0 mg/dL から約30mg/dL、特に0 mg/dL から約15mg/dL の範囲の蛋白値を識別することができない。低い蛋白濃度値を識別することは、約10mg/dL から20mg/dL の範囲が健康な個体の定常な尿蛋白値として使用されているため、この技術分野において臨床上重要である。したがって、0 mg/dL から約10mg/dL までの尿蛋白値は、生理的不均衡をもたらす潜在的蛋白欠乏を示しているかもしれず、約20mg/dL を超える尿蛋白値は、疾病状態を示唆する蛋白の過剰排泄を示しているかもしれない。比較的高い範囲、例えば約100 mg/dL から2000mg/dL の尿蛋白濃度に関しても、本発明の方法によると、色の

3 3

所定の蛋白成分に対して透過性である硬化ポリマーの層、フィルムまたは膜から成るキャリアマトリックスに組み込まれた二指示試験組成物を有する新規で改良された試験試験細片を提供することである。

本発明のその他の目的は、低分子蛋白をも含めた蛋白の定量分析のための新規で改良された試験装置を提供することである。

上記及びその他の目的ならびに本発明の利点及び新規な特徴は、試験試験細片における変色の色分解度の改良及び蛋白に対する感度の増大、さらにはより正確な半定量測定の実現を説明する添付の図面で例示した本発明の好ましい実施態様についての以下の詳細な説明により明らかになるであろう。

発明の詳細な説明

本発明の方法によると、尿またはその他の試験試料中のアルブミン及び／または低分子蛋白などの蛋白についての定性及び／または半定量試験は、二指示試験組成物を用いることにより達成さ

3 2

分解度が改良され、尿蛋白濃度に対する感度が増大される。もっとも、この濃度範囲においては、このような高い蛋白値は、より本格的な診断の必要がある明らかに異常な生理的状态を示唆しているため、臨床上的利点はそれほど重要ではない。

さらに、尿試験に関しては、低分子蛋白、例えばベンス・ジョーンズ蛋白の低い値での存在は、白血病または骨髄腫などの特定の疾病状態を示唆している。したがって、本発明の装置及び方法のもう一つの重要な特徴として、二指示試験組成物の使用によりもたらされる色の分解度の改良、及びその結果である尿中の低い値の蛋白に対する感度の増大は、尿中に存在する低分子蛋白の濃度を検出及び測定する技術を提供する。したがって、本発明の詳細な説明においてこの後でより詳細に述べられるとおり、アルブミンなどの高分子蛋白による干渉を除くことにより、尿中の蛋白総含有量または尿中の低分子蛋白の含有量のいずれかにについて試験を実施するために、一つの方法及び装置が利用できる。

3 4

特開平 2-122264(10)

さらに、尿を試験することに加えて、本発明の方法及び装置はまた、血しょう及び血清中のアルブミンの有無及び半定量的濃度、そしてより一般的には、その他多くのアルブミン含有液体のアルブミン含有量を測定するために使用することもできる。本発明の他の重要な特徴によると、本発明の方法及び組成物は、尿またはその他の液体試験試料中の蛋白の有無及び／または濃度を測定するために、水性液体相式試験及び、本発明の利点を十分に生かせるよう、乾式試験パッド試験の両方において用いることができる。

驚くべきことであり、また思い掛けないことであるが、一定のpH値に維持されると、それぞれが蛋白と相互作用して検出可能で測定可能な変色を受ける能力を有する二つの適当な指示薬色素を組み合わせ、試験試料中の蛋白の有無及び／または濃度を測定する色素結合法において使用する場合、色の分解度が改良され、低蛋白濃度に対する感度が増大されることが分かった。二指示試薬組成物を用いる色素結合法は、蛋白に関してのより

3 5

のpHをその色素にとっての変色pHよりわずかに低く維持する緩衝剤を含んでいる。指示薬色素を十分に緩衝化することで、試験試料との接触により発生するpH変化が原因ではなく蛋白との相互作用が原因で色素が変色することが本質的に保証される。

本発明の重要な特徴によると、適当なpH値に適切に緩衝化された指示薬色素の一群を賢明に選択することで、液体試料中の総蛋白含有量のより正確で信頼性のある試験が提供される。そのうえ、驚くべきことであり、また思い掛けないことであるが、重合性ウレタン含有のフィルム、層または膜から成るキャリアマトリックスを含む乾式試験スティックに二指示試薬組成物を組み込むことにより、試験試料中から低分子蛋白を選択的に検出及び測定することが可能である。さらに、低分子蛋白の検出及び測定が、主要成分であって、競合、干渉している高分子蛋白、例えばアルブミンを試験試料から分離することなく実施できる。したがって、時間がかかり過ぎ、費用の大きな追加

3 7

正確で信頼性のある臨床上意義ある半定量試験を提供する。現在のところ、液体相式試験及び市販されている乾式試験細片試験は、単一の色素のみ、例えばテトラブロモフェノールブルーまたはテトラクロロフェノール-3,4,5,6-テトラブロモスルホンフタレインのみを、試験試料中の蛋白の有無及び／または半定量濃度を測定するための指示薬色素として用いている。

蛋白の試験において現在使用されている色素は蛋白と相互作用し、適切で一定のpHに維持されている場合に、蛋白誤差現象が原因で変色を受ける。蛋白誤差現象は、Kestonの米国特許第3,485,587号において詳細に記載されている。このKestonの特許では、様々な色素、正しいpH範囲及び蛋白誤差現象を観察するために必要な緩衝剤が開示されている。Kestonの特許は、基本的には、尿中の総蛋白含有量の試験に用いられる今日の乾式試験細片に記載している。この総蛋白試験細片は、普通、5またはそれ以下の強酸性pHで通常に変色を受ける指示薬色素、及び該指示薬色素

3 6

の操作段階が回避される。そのうえ、家庭または実験室内で実施可能で、低分子蛋白についての本質的に即座の試験結果を出す迅速かつ正確で再現性があり信頼できる試験方法が達成される。

本発明によりもたらされる利点を得るためには、二指示試薬組成物が指示薬色素を適当な組み合わせで含んでいることが必須である。単一の指示薬色素を用いる先行技術の試験及び現在商業的に利用可能な測定法とは対照的に、それぞれが本質的に同一の変色pH範囲を有し、いずれも同一の変色を受けない二つの指示薬色素を組み込むことによって、蛋白との相互作用で生じる視覚及び機器による色の分解度及び識別が改良される。したがって、蛋白試験の感度、特に比較的低い蛋白濃度における感度が増大する。

本発明の方法は、先に述べた「蛋白誤差」現象を利用する。しかし、二つの指示薬色素を二指示試薬組成物に組み込むと、調整したpHでの試験試料中の利用できる蛋白を求めて二つの指示薬色素間の競合的相互作用の原理が誘発される。先に述

3 8

特開平 2-122264(11)

べたように、pH指示薬色素が蛋白と相互作用すると、色素の目に見えるpKaが変更され、いわゆる「蛋白顕差」を起こしながら変色起きる。しかし、それぞれがほぼ同一の変色pH範囲を有する二つの指示薬色素を用いると、二つの変色が同時に観察される。二指示薬色素の相対量を、各色素が蛋白と相互作用する能力に関連して、かつ実際の変色及び各色素の変色の強さに関連して、調整することにより、より際立った発色が可能になり、蛋白と相互反応した際の色の分解度及び識別が改良され、したがって試験の感度も増大される。

一般に、基本的必要条件が満たされれば、いかなる二つのpH指示薬色素をも本発明の方法に利用することができる。先ず、各色素が、蛋白と相互作用し、その相互作用に反応して検出及び測定可能な変色を受けることができることが最も重要である。二指示薬組成物に利用される指示薬色素は、試験試料中の非蛋白成分とのいかなる競合する化学的または物理的相互作用に対抗して、蛋白

39

の色素と試験試料中に存在する蛋白との相互作用にตอบสนองして発生する第二の変色によって平衡化及び修正されることはない。

第二に、二指示薬組成物に用いられる各指示薬色素は、ほぼ同じpH範囲で変色を受けなければならない。通常は、二つの色素間で約0.5 pH単位までの変色pH範囲の差異は許容できる。しかし、本発明の利点を最大に利用するには、二つの色素間の変色pH範囲の差異は、約0.2～0.3 pH単位に制限することが好ましい。色素結合法では変色はpH変化が原因ではなく蛋白との相互作用が原因で発生することを保証するため指示薬色素が一定のpH、通常は色素の変色pH範囲のわずかに下に維持されることから、同等またはほぼ同等な変色pH範囲が要求される。本発明の方法によると、各色素は、その最大限の変色が示され、したがって色の分解度を相当に改良し、試験感度を大幅に増大すべく、色素が変色するpH範囲よりわずかに低いpH値に緩衝化される。したがって、二指示薬組成物全体についての変色を最大限にするために、二

41

と優先的に反応しなければならない。非蛋白成分との感知できる程度のいかなる競合的相互作用も、試験試料中の蛋白の有無及び量に關しての誤った試験結果に至る可能性がある。例えば、指示薬色素を適切に緩衝化すると、試験試料が緩衝剤の効果を超えるほどアルカリ性であるとき以外のすべての場合に、pH変化が原因で変色が発生する可能性を払拭する。

さらに、各色素が、蛋白と相互作用するための比較的類似した親和力を有することが重要である。一方の色素がもう一方の色素の約10倍から15倍以上の対蛋白の親和力を有する場合、一方の色素と蛋白との優先的相互作用が試料中の蛋白濃度と正確に相関しない変色を発生させることから、誤った試験結果が得られる可能性があることが発見されている。もう一方の色素が蛋白と効果的に相互作用することができないと、第一の色素のみが蛋白相互作用にตอบสนองして変色を受けることから、高過ぎて誤りであるか、または低過ぎて誤りである結果に至ることがあり、この変色は、第二

40

指示薬色素は、ほぼ同等のpH範囲で変色を受けなければならない。

最後に、二指示薬組成物において用いられる色素は、相互に干渉し合わない変色を受けなければならない。例えば、各色素が、比較的弱い色彩からより強烈な色彩へと変色を受ける場合、色の分解度の改良及び試験感度の増大による利点は無効または最小限になることがある。同様に、本発明により提供される利点はまた、第一の色素が第二の色素本来の色に変色し、第二の色素が第一の色素本来の色に変色する状況においても、最小限になるかまたは無効になる。例えば、一定pHにおいて、蛋白との相互作用に先立ち、第一の色素が赤色で、第二の色素が無色であるとし、試験試料中の蛋白との相互作用により、第一の色素が赤から無色への変色を受け、第二の色素が無色から赤への変色を受ける場合、色の分解度及び試験感度の改良による利点は、その試験が視覚的または機器によって観察されているにかかわらず、減少するかまたは無効になる。したがって、本発明の利

42

特開平 2-122264(12)

点を最大限に利用するには、二指示試薬組成物において用いられる色素は、第一の色素が比較的高い色彩からより弱い色彩に変色し、第二の色素が第一の色素のより弱い色彩とは異なる比較的低い色彩から、第一の色素の比較的高い色彩とは異なるより高い色彩に変色するとく組み合わせて選択される。

二指示試薬組成物の両色素が、蛋白と相互作用してほぼ同等のpH範囲で充分かつ対照の著しい変色を受ける能力を有するなら、いかなるpH指示色素も本発明の方法において使用することが可能であることが分かっている。いくつかの化学的及び物理的パラメータ、例えば蛋白と相互作用する能力、変色の強さ及び色素間の化学的互換性に依存して、二指示試薬組成物中の第一の指示色素と試薬組成物の第二の指示色素との割合は、ほぼ5:1から1:5、優先的には、ほぼ3:1から1:3の範囲であることができる。二指示試薬組成物中の第一の指示色素と第二の指示色素との正確な割合は、最大の視覚的色分解度及び最

4 3

変色するよう、充分な量の緩衝剤を必要とすることがありうる。

さらに、様々な種類の公知の緩衝剤のいずれをも、本発明の二指示試薬組成物に使用することができることが証明されている。緩衝剤の機能は、蛋白の存在が原因の指示薬における所望の変色を起こさせ、蛋白含有試験試料のpH変化による変色を本質的に除去すべく、試薬組成物をほぼ一定のpHに維持することである。その結果、二指示試薬組成物に組み込まれる緩衝剤の量は、試験試料の性質に依存する。緩衝剤の量は、通常、約100ミリモル(mM)から約500ミリモルの範囲であるが、特定の場合には、この範囲より上または下にすることができる。使用される緩衝剤の性質は、二指示試薬組成物に組み込まれた指示薬に依存し、それに応じて変化する。しかし、最高の結果を得るためには、試薬組成物のpHは、一般に、試薬組成物の二指示色素が変色を受けるpH範囲よりほんのわずかに低いpH値に維持されるべきであることが分かっている。試薬組成物の特定の指示色素に

4 5

大の感度を有する蛋白試験を行なうべく、試験キットを設計する当業者によって決定されることができる。本発明の二指示試薬組成物において用いられる指示色素は、その分野の当業者には周知である方法で調製することができる。そのうえ、本発明の方法において利用できるいくつかの指示色素は、現在市販されている周知の酸塩基指示色素である。

上述したとおりの指示色素の組み合わせが、尿またはその他の液体試験試料中の蛋白の有無及び/または半定量濃度を測定する改良方法において指示試薬組成物として利用される。本発明の二指示試薬組成物は、蛋白と相互作用した結果、「蛋白誤差」現象により視覚及び/または機器により識別可能かつ測定可能な変色を起こすことが示されている。しかし、色素の組み合わせに加え、本発明の二指示試薬組成物は、試験試料中の蛋白の有無及び/または半定量濃度を正確に測定すべく、色素がpH変化の結果として変色するのではなく、蛋白との接触及び相互作用の結果として

4 4

ついて適当な緩衝pH値を決定し、二指示試薬組成物において使用することができる特定の緩衝剤を決定する方法は、Kestonの米国特許第3,485,587号に記載されている。

本二指示試薬組成物においては、緩衝剤の使用が好ましいが、緩衝剤はすべての場合に必須であるとは限らない。例えば、特別な場合には、試験試料が二指示試薬組成物と接触する前に、尿またはその他の試験試料に緩衝剤を添加することが望ましいかもしれない。また、試験試料は、組成物を一定のpHに維持するために適切な種類の緩衝剤を適切な量ですでに含有していてもよく、あるいは、二指示色素組成物は、pH変化に対して無反応であるかもしれない。そのような場合には、二指示色素は、二指示試薬組成物における唯一の活性成分であることができる。しかし、指示色素及び/または緩衝剤の性質及び機能を物質的に変化させず、蛋白試験に緩衝しない任意の成分、例えば界面活性剤もまた、二指示試薬組成物中に包含せしめることができることは理解されるべき

4 6

特開平 2-122264(13)

である。同様に、その他のこのような非必須成分には、非反応性バックグラウンド色素、ポリマー及び可塑剤がある。

尿またはその他の試験試料に接触した際、二指示試薬組成物の変色は蛋白の存在を表示する。さらに、変色の強さ及び程度は、試験試料により発生した色を既知の濃度の蛋白を有する溶液により発生した色と比較または相関させることで、試験試料中の蛋白の半定量濃度を測定するために使用することができる。本発明の重要な特徴によると、二指示試薬組成物は、試験試料中の蛋白の量が分光光度計または比色計などの測色機器を使用しなくとも測定及び正確に決定されうべく、十分に分解及び識別された変色を提供するということが証明されている。しかし、所望なら、そのような測色機器を使用して試験試料と既知のアルブミン濃度を有する溶液との間の色の程度及び強さの差異を測定することができる。

したがって、適当に緩衝化した二指示試薬組成物を利用する蛋白試験は、試験の精度及び信頼性

を向上し、さらに試験に対する医師の信頼をも増大する。そのうえ、実験室内の訓練された医師または技術者とは異なって、未熟な患者により家庭で実施される蛋白についての尿試験の件数を考慮すると、尿中の蛋白含有量についての正確で信頼できる半定量試験方法を提供することが必要である。

本発明の重要な特徴にしたがって、表 I では、本発明の二指示試薬組成物中で蛋白指示薬色素として用いることができる代表的な pH 指示薬色素をリストしている。表 I には、現在蛋白試験に使用されている指示薬色素に加え、約 2.8 から 5.2 の pH 範囲で変色を受けるその他いくつかの適当な指示薬色素をも含めている。

4 7

表 I

蛋白指示薬色素		
指示薬色素	変色	変色の近似 pH 値
プロモクロロフェ		
ノールブルー (BCPB)	黄-緑	2.8
ヨードフェノール		
ブルー (IPB)	黄-青	2.8
ローズベンガル (RB)	無色-ピンク	2.8
プロモフェノール		
ブルー (BPB)	黄-青	3.0
メチルオレンジ (MO)	赤-黄	3.0
テトラプロモフェ		
ノールブルー (TBPB)	黄-青	3.3
プロモピロガロール		
レッド (BPGR)	黄-赤	3.5
プロモクレゾール		
グリーン (BCG)	黄-緑	4.3
テトラプロモフェ		
ノールフタレインエ		
チルエステル (TBEE)	黄-緑	4.3

4 9

4 8

プロモフェノール

レッド (BPR) 黄-赤 4.7

H L O 3 O 1 * 無色-緑 4.7

プロモクレゾール

パープル (BCP) 黄-紫 5.2

* H L O 3 O 1 は、化学名 8-アミノ-11-アザ-6-チア-[5,12-ナフクセンキノ] を有する四環式色素である。

表 I の蛋白指示薬色素の一覧は、酸性 pH で変色を受ける色素を含む部分的一覧である。一般に、蛋白についての試験は、指示薬色素は低い酸性 pH 値でより強力に蛋白と相互作用することができるという理由から、酸性 pH において、酸性 pH で変色を受ける指示薬色素を用いて実施されてきた。低い pH 値での指示薬色素と蛋白間の相互作用は、正荷電カチオン蛋白分子と負荷電アニオン指示薬色素分子間の強力な引きつけが原因で、さらにそれに加えて、酸性状態が部分的に蛋白を変性させ、その結果指示薬色素と相互作用する蛋白の能力を増強するべく作用することが原因で、増大する。

5 0

特開平 2-122264(14)

しかし、蛋白と相互作用し約5.2以上のpH値で変色を受けることができるその他の指示薬色素もまた、本発明の方法において用いることができることは理解されるべきである。

したがって、酸性または中性からアルカリ性のいずれかのpH範囲で変色を受けることができるその他の指示薬色素を組み合わせ、色の分解度及び鑑別の改良ならびに試験感度の増大を提供する二指示試薬組成物を調製することもできる。しかし、二指示試薬組成物に含まれる指示薬色素は蛋白と相互作用することができなくてはならず、二つの色素はほぼ同等のpH範囲内で変色を受けなければならない。そして色素は十分に差異が明らかな変色を受けなければならない。本発明の方法において使用することができ、下は0.15から上は14までの範囲の変色pHを有するその他のpH指示薬色素の例は、The Merch. Index, Ninth EditionのMISC-94及びMISC-95頁(1976年)、及びHandbook of Chemistry and Physics, 51st EditionのD-106～D-109頁(1970～1971年)に

5 1

(MO)にのつての変色pHと同等またはほぼ同等である近似の変色pHを有する。したがって、ローズベンガル(RB)は、メチルオレンジ(MO)と組み合わせて二指示試薬組成物を調製するには適当な指示薬色素ではないかもしれないことに注意すべきである。ローズベンガル(RB)は蛋白と相互作用することができ、メチルオレンジ(MO)にのつての変色pHに近似した変色pHを有するが、無色からピンクへのローズベンガル(RB)の変色は、赤から黄へのメチルオレンジの変色に類似するのに充分であることから、色の分解度の改良及びその結果の試験感度の増大という利点が達成されないかもしれない。

別の例においては、黄から赤への変色を有するプロモフェノールレッド(BPR)は、黄から緑への変色を有するプロモクレゾールグリーン(BCG)と組み合わせると、試験試料中の蛋白含有量の増加に対応して黄から緑そして紫へと連続する変色を発生する。同様に、黄から赤への変色を有するプロモフェノールレッド(BPR)は、無色から緑への

5 3

掲載されている。それに加え、その他いくつかの適当なpH指示薬色素が数多くの製造元及び販売元から市販されている。

本発明の重要な特徴によると、いくつかの適当な組み合わせの指示薬が、表Iにリストしている指示薬から想定される。例えば、メチルオレンジ(MO)は、プロモクロロフェノールブルー(BCPB)、プロモフェノールブルー(BPB)、テトラプロモフェノールブルー(TBPB)またはヨードフェノールブルー(IPB)と組み合わせられ、色の分解度を向上し、その結果試験の感度を増大する変色を発生することができる。それぞれの場合において、蛋白との相互作用以前には、メチルオレンジ(MO)の強い赤色がきわだっている。しかし、蛋白との相互作用及び色素の変色の後は、結果的なメチルオレンジ(MO)の黄色は、第二の色素のより強烈な緑または青に圧倒される。さらに、これら第二の指示薬色素(BCPB、BPB、TBPB及びIPB)とメチルオレンジ(MO)のそれぞれは蛋白と相互作用することができ、各第二の指示薬色素はメチルオレンジ

5 2

変色を有する8-アミノ-11-アザ-6-チア-[5,12-ナフタセンキノン](HLO301)と組み合わせると、試験試料中の蛋白含有量の増加に対応して黄から橙そして紫へと連続する変色を発生する。

本発明の方法により達成される新規で予期せぬ結果を証明するために、プロモフェノールブルー(BPB)とメチルオレンジ(MO)の指示薬を含む二指示試薬組成物を調製し、試験試料の蛋白総含有量についての水性液相試験に使用した。プロモフェノールブルー(BPB)及びメチルオレンジ(MO)の双方とも、蛋白と相互作用し、ほぼ同一のpH3で変色を受ける。プロモフェノールブルー(BPB)は黄から濃青へと変色し、メチルオレンジ(MO)は濃赤から黄へと変色する。適当な緩衝剤とともに適量のプロモフェノールブルー(BPB)及びメチルオレンジ(MO)を含む二指示試薬組成物は、標準蛋白溶液と接触すると表IIに要約されている変色を起こした。

5 4

特開平 2-122264(15)

表II

標準蛋白溶液 (pH=3.2) と相互作用した際のメチルオレンジ/プロモフェノールブルーニ指示試薬組成物の変色

標準蛋白溶液 の濃度 (mg/dL)	観察された色
0 (ブランク)	赤またはオレンジ
10 (痕跡量)	黄または 非常に淡い緑
30	淡緑
60	青緑
100	青
300	濃青

本発明の重要な特徴により、メチルオレンジ/プロモフェノールブルーの二指示試薬組成物を使用することによって達成される色の分解度の改善により、0、10、20及び30mg/dLの蛋白濃度の間の検出及び識別が可能になる。対照的に、単一の指示薬色素を用いた先行技術の方法はいずれ

5 5

結果、約100 mg/dLの蛋白が尿中に存在することが分かった。

一般的に、蛋白についての水性液相試験では、変色を視覚及び/または機器により検出及び測定するのに十分な量の二指示試薬組成物を用いる。しかし、蛋白以外の試験試料成分との非特異的な相互作用を実質的に排除すべく、過剰量の二指示試薬組成物の使用は避けるべきである。通常は、二指示試薬組成物中の色素の総濃度は、約0.5mMから約5mMの範囲であれば、視覚及び/または機器により検出可能かつ識別可能な変色を起こし、蛋白以外の試験試料成分との色素の相互作用による試験障害を排除または最小限にするには充分である。本発明の利点を最大限に利用するには、二指示試薬組成物中の色素の総濃度は約0.5mMから約2mMの範囲が特に好ましいことが分かっている。そのうえ、上記の例で使用されるクエン酸緩衝液に加えて、所望のpHは、適当な緩衝剤、例えばマロン酸塩、乳酸塩、トリクロル酢酸塩、スルホサリチル酸塩、酒石酸塩、リン酸塩、硼酸塩、

5 7

も、0から約15mg/dLの範囲では蛋白値を識別することができず、0から約30mg/dLの範囲の蛋白値については最低限の識別しか行うことができない。しかし、本発明によると、試験感度の改善が、特に約30mg/dL及びそれ以下の試験試料の蛋白値において達成され、最終的に、より正確で意味のある試験結果が提供される。

蛋白総含有量についての液相試験を実施するには、最初に二指示試薬組成物を製造する。例えば、ある二指示試薬組成物の製造として、プロモフェノールブルー(BPB)0.60g(0.90ミリモル)及びメチルオレンジ0.60g(1.83ミリモル)を充分な量の100mMクエン酸緩衝液に溶かすと、pH3.2に緩衝化されたプロモフェノールブルー(BPB)について0.9mMであり、メチルオレンジについては1.83mMである二指示試薬水性組成物1リットルが得られる。尿試料中の蛋白の有無及び濃度は、該二指示試薬組成物1mLに尿を一滴[約50μL(マイクロリットル)]滴下することにより測定した。得られた溶液の色は赤から青に変化し、その

5 6

酢酸塩、ピペラジン-N,N'-ビス(2-ヒドロキシプロパン)スルホン酸(POPSO)、N-2-ヒドロキシエチルピペラジン-N'-2-エタンスルホン酸(HEPES)、3-N-(トリス-ヒドロキシメチル)メチルアミノ-2-ヒドロキシプロパンスルホン酸(TAPSO)、2-([トリス-(ヒドロキシメチル)メチル]アミノ)エタンスルホン酸(TES)またはこの分野で周知のその他の適当な緩衝剤を使用することにより、実質的に一定の値に維持することができることも分かっている。

さらに、二指示試薬組成物に含まれる二指示薬色素は、必ずしも同量で存在しなければならないわけではない。各色素の相対量は、様々なパラメータ、例えば色素の変色の強さ及び蛋白と相互作用する色素の能力に依存する。しかし、第一の色素と第二の色素との比率を、約5:1から約1:5、好ましくは約3:1から約1:3の範囲にすると、本発明の利点が充分に得られることが分かっている。

そのうえ、本発明の別の重要な特徴によると、

5 8

特開平 2-122264(16)

既知の蛋白濃度の溶液から得られた標準色に視覚及び／または機器により比較することが可能であるように、検出可能かつ鑑別可能な変色を起こさせるために水性溶媒、二指示試薬組成物及び尿試料の相対量を変化させ、さらに色素及び緩衝剤の種類及び量を変化させることにより尿またはその他の液体試験試料中の蛋白の水性半定量試験用の装置を設計することは、試験装置を製作する当業者の実験技術の範囲内に充分入る。

蛋白の湿式水性試験に使用する他に、二指示試薬組成物は、蛋白の乾式試験パッド試験に使用することもできる。二指示試薬組成物を用いる蛋白の乾式試験パッド試験は、この分野で周知の方法に従って実施される。一般に、蛋白の試験は、尿またはその他の試験試料を二指示試薬組成物を含む被検体検出部に接触させることにより実施される。被検体検出部を試験試料中に浸漬するか、あるいは、試験試料を被検体検出部に滴下する方法が利用できる。被検体検出部の色について起こる変化が蛋白の存在を表わす。さらに、そのように

5 9

むことができるいかなる物質であってもよい。「キャリアマトリックス」という呼称は、水及びその他の生理学的流体に対して不溶性であり、かつ水及びその他の生理学的流体に暴露された際に構造上の一体性を維持する吸水性または非吸水性マトリックスのことを言う。適当な吸水性マトリックスには、濾紙、スポンジ材料、セルローズ、木材、織布及び不織布などがある。非吸水性マトリックスには、ガラス繊維、ポリマーフィルム及び予備成形もしくは微孔質の膜がある。その他適当なキャリアマトリックスには、親水性無機粉末、例えばシリカゲル、アルミナ、珪藻土など；粘質物；布；親水性天然高分子材料、特にセルローズ系材料、例えばセルローズビーズ、及び特に繊維含有紙、例えば濾紙もしくはクロマトグラフィー紙；合成または変性天然ポリマー、例えば酢酸セルローズ、ポリ塩化ビニル、ポリアクリルアミド、ポリアクリル酸エステル、ポリウレタン、架橋デキストランもしくはアガロース；ならびにそのようなものの架橋または非架橋の水不

6 1

試験具を設計することによって、得られる変色を、標準色票と比較して、尿または試験試料中の蛋白濃度の半定量測定を行なうことができる。

通常、被検体試験具は、単一パッド試験細片（単一の分析対象物のみの試験用）または複式パッド試験細片（複数の分析対象物の同時分析用）のいずれかとして設計されている試薬含浸型試験細片である。いずれの形態の試薬含浸型試験細片についても、試験細片は、通常、疎水性プラスチックで構成された支持細片、つまりハンドル、及び吸水性または非吸水性キャリアマトリックスから成る試薬試験パッドを含む。一般に、キャリアマトリックスは、試験試料がマトリックスを通して毛管作用に応じて移動し、指示試薬組成物に接触して検出可能かつ測定可能な変色を起こすことを可能にする吸収材料である。

キャリアマトリックスは、化学試薬に関して実質的に不活性であり、液体試験試料に関して多孔質及び／または吸収性である限り、対象の試験を実施するために必要とされる化学試薬を組み込

6 0

溶性親水ポリマーがある。疎水性及び非吸収性物質は、本発明のキャリアマトリックスとして使用するには適していない。キャリアマトリックスは、種々の化学組成物または化学組成物の混合物から成ることができる。マトリックスはまた、硬度・軟度と合わせた滑らかさ・荒さの点でも変化する。しかし、あらゆる場合において、マトリックスは、親水性または吸収性材料を含まなければならない。ハンドルは、通常、疎水性材料、例えば酢酸セルローズ、ポリエチレン、テレフタル酸エステル、ポリカーボネートまたはポリスチレンから形成され、キャリアマトリックスは、吸水性濾紙または非吸水性ポリマーフィルムから構成されることがもっとも好ましい。

本発明の利点を最大に利用するには、二指示試薬組成物は、適当なキャリアマトリックスに含浸され、試験試料中の蛋白の試験のための乾式試験細片中で用いられる。本発明の方法により、家庭または実験室内で実施することができる試験試料中の蛋白の総濃度についての低廉で正確で信頼

6 2

特開平 2-122264(17)

性が高い試験法が提供される。さらに、本発明の方法により、試験試料中の低い蛋白濃度の検出、識別及び測定が可能になり、その結果、試験が臨床的により有用なものとなる。

本発明の方法によると、蛋白の乾式試験細片試験を実施するには、約0.5mM から約5mMの総濃度でメチルオレンジ(MO)とプロモフェノールブルー(BPB)の二指示薬色素を含む水溶液を最初に準備する。次に、二色素を含んでいる水溶液を、濾紙のシートまたは予備切断された細片上に塗布、浸漬または噴霧することにより、吸水性材料、例えば濾紙を該水溶液で飽和及び含浸する。約20~30分間空気炉内約50℃でオープン乾燥して水性溶媒を除去した後、pH3.2の250mMクエン酸緩衝液を浸漬または噴霧して濾紙を飽和及び含浸する。約50℃で20~30分間オープン乾燥した後、二指示薬組成物で含浸した濾紙を適当な大きさ、例えば約0.25cm×0.5cmから約0.5cm×1.0cmのサイズに切断する。他の方法として、すべての成分を一含浸液中に合わせ、それにより二段階浸漬の含浸

手法の必要性を回避することも場合により可能である。単一段階浸漬法は、緩衝液への二回目の浸漬により色素のいくらかが吸水性マトリックスから浸出するほど二色素が水溶性である場合、特に薦められる。

その後、二指示薬組成物で含浸した濾紙を両面接着テープを用いて不透明もしくは透明な疎水性プラスチックハンドルに固定する。次に、得られる試験細片を新鮮で遠心分離していない尿試料中に試験パッドが試料で飽和するのに十分な時間だけ浸漬する。所定の間、例えば15~60秒間放置した後、応答の有無について試験細片を視覚または機器により検査する。試験パッドの藍色が見られるなら、それは尿試料中の蛋白の存在及び/または濃度を表わしている。

上述した蛋白の水性液相試験と同様、本発明の方法及び組成物を用いる蛋白の半定量試験を設計するために、試験パッドのサイズと、試験含浸用溶液の濃度と、試験試料の量と、試験試料を試験細片に導入する方法、例えば浸漬ではなくピペッ

6 3

トの使用との間で適切な均衡を決定することは、試験具を製造する当業者の実験技術の範囲内に充ち入る。

多くの場合、試験細片を視覚的に観察することにより所望の情報が得られる。より正確な情報が求められる場合は、試験細片で使用される特定の二指示薬組成物に対して様々な既知の蛋白濃度に相当する色点を有する色票(カラー・チャート)を調製することができる。尿試料との接触の後に得られる試験細片の色は、色票の色点と比較され、この結果試験試料の蛋白濃度を測定することができる。

より一層正確な測定が求められる場合は、分光光度計または比色計を使用して、より正確に変色の程度を測定することができる。さらに、水性液相式試験及び乾式試験細片試験の双方とも、視覚的技術とは異なって、分光光度または測色技術を用いることで反定量化され、より確実でより正確に変色の程度を測定し、その結果、より正確に試験試料中の蛋白の濃度、特に比較的低い蛋白濃

6 5

6 4

度、例えば30mg/dL未満の濃度、を測定することができる。

図1~4の詳細な説明において、以下、より詳しく説明するとおり、二指示薬組成物を用いて試験試料中の低濃度の蛋白を検出、識別及び測定する能力は、驚くべきことに、かつ、思い掛けないことに、試験試料中に存在するかもしれない検出困難な低分子蛋白を試験する方法を提供する。例えば、尿中の低分子量のベンス・ジョーンズ蛋白の存在は、患者が白血病または骨髄腫にかかっているという医療診断上の兆候である。しかし、従来の方法によると、尿中のベンス・ジョーンズ蛋白の検出は、高価で時間がかかり過ぎる加熱・沈殿技術が必要とする。さらに、乾式試験細片は、尿中の高分子蛋白、例えばアルブミンがベンス・ジョーンズ蛋白試験に干渉し、それを遮蔽する理由から、ベンス・ジョーンズ蛋白の試験には使用されてこなかった。尿中には高分子蛋白がベンス・ジョーンズ蛋白より相当多大な量で存在し、このためその高分子蛋白が指示薬色素と優先

6 6

特開平 2-122264(18)

的に反応する。そのうえ、ペンス・ジョーンズ蛋白を尿中の他の蛋白成分から分離することは、従来のペンス・ジョーンズ蛋白試験と同様に高価で時間がかかるものであり、結果的に、乾式試験細片試験に先立つ蛋白分離段階が意味のない操作試験となる。したがって、本発明の方法以前は、乾式試験細片技術を利用して通常尿中に見られる低濃度のペンス・ジョーンズ蛋白を正確に検出及び測定することはできなかった。

したがって、本発明の重要な特徴によれば、二指示試薬組成物を適当なキャリアマトリックスに含浸することにより、尿試料中のペンス・ジョーンズ蛋白の有無および濃度が乾式試験細片を使用することにより確認されることが証明された。驚くべきことであり、思い掛けないことであるが、ペンス・ジョーンズ蛋白の乾式試験細片試験が、ペンス・ジョーンズ蛋白を試料から分離することなく、さらにペンス・ジョーンズ蛋白試験が尿中に存在するより豊富で干渉効果の強いより高分子の蛋白により遮断されることなく、実施で

67

は、キャリアマトリックスは、セルロース材料、例えば紙及び好ましくは濾紙を含む親水吸水性マトリックスとする。濾紙は、本発明の吸水性マトリックスに要求される特性のすべて、それに加え豊富な入手性、好ましい経済性及び様々な品質等級という利点を有する。濾紙は、指示薬色素及び緩衝剤の両者を懸濁及び配置するためのマトリックス材料として使用するには極めて満足なものであることが分かった。

しかし、試験試料中の低分子蛋白、例えばペンス・ジョーンズ蛋白の有無及び/または濃度を測定するための方法及び試験具に二指示試薬組成物を用いる場合においては、濾紙及び吸水性セルロースのマトリックスは不適であることが分かった。吸水性濾紙のマトリックス及び同様の吸水性のマトリックスは、比較的高分子の蛋白、例えばアルブミンが吸水性マトリックスを透過し、含浸した二指示試薬組成物と接触及び相互作用して変色を起こすことを可能にするのに充分なだけの多孔性を有する。したがって、尿またはその他の試

69

きる。先に述べたように、試験試料中の蛋白質の試験に使用される乾式試験細片は、一般に、指示試薬組成物によって処理及び含浸され易く、尿もしくはその他の試験試料が、比較的迅速に蛋白質試験を行なうのに充分なだけ急速にキャリアマトリックスに浸透する、ことを可能にし、そしてその後の試験を不確定、不正確もしくは疑わしくするような方法で、尿もしくはその他の試験試料を、キャリアマトリックスを構成する成分の試験試料による抽出、または、尿もしくはその他の試験試料を相当に変質することのいずれかにより、汚染しない；吸収性マトリックスから成るキャリアマトリックスを含む。

試験細片が試験試料の蛋白総含有量の試験用として設計されている場合、キャリアマトリックスは、指示試薬組成物により含浸した試験細片の試験域を飽和すべく試験試料が透過することを可能にするいかなる吸水性もしくは非吸水性材料であってもよい。本発明の利点を最大に利用するために、試験試料の蛋白総含有量の試験において

68

試験試料中に割合としては大量に存在する比較的高分子の蛋白は、試験試料中に割合として少量で存在する低分子蛋白の検出を妨げる。その結果、比較的高分子の蛋白を除外するには充分なほど小さい多孔性を有し、同時に低分子蛋白による透過を許すには充分なほど大きな多孔性を有するキャリアマトリックスに二指示試薬組成物を組み込むことにより、試験試料中の低い値の低分子蛋白を検出及び/または識別する方法が提供される。

本発明の重要な特徴によると、重合ウレタンを基材とするフィルム、層または膜は、低分子蛋白、例えばペンス・ジョーンズ蛋白の浸透を許し、同時により豊富な比較的高分子の蛋白、例えばアルブミンの浸透を妨げるに充分な多孔性を有するキャリアマトリックスとなることが分かった。以下に記載する本発明の実施態様において実証されるように、二指示試薬組成物は、ウレタンを基材とするフィルム、層もしくは膜を成形した後、または、重合ウレタン基材のフィルム、層もしくは膜の成形中のいずれかにおいて、該重合ウ

70

特開平 2-122264(19)

レタンを基材とするフィルム、層または膜に組み込むことができる。しかし、いずれの場合にも、重合ウレタンを基材とするフィルム、層または膜は、該フィルム、層または膜が蛋白を検出する試験具において使用される前に、必要に応じて適当な緩衝剤により処理されなければならない。そのうえ、重合ウレタンを基材としたフィルム、層または膜は、試験試料中のベンス・ジョーンズ蛋白の検出及び測定を可能にするに適した多孔性を有しなければならない。また、重合ウレタンを基材とするフィルム、層または膜を本発明の二指示試薬組成物とともに利用して液体試料の蛋白総含有量を試験することができるように、比較的高分子量の蛋白、例えばアルブミンによる浸透を許すのに充分なほど高い多孔性を有する重合ウレタン基材のフィルム、層または膜を製造することができることをも理解すべきである。

適切な多孔性の重合ウレタンを基材とするフィルム、層または膜を得るには、ウレタン化合物、例えばウレタンプレポリマーを、重合性ウレタン

7 1

リヤーマトリックスが、ウレタン含有組成物を硬化させることにより、層状に成形される。このキャリヤーマトリックスを、細片に、それからパッドに裁断し、プラスチックのハンドルに固定する。

重合またはさらなる重合が可能なウレタン化合物、例えばオリゴマー、プレポリマー、完全に硬化していないポリマーもしくはそれらの混合物を含む重合性ウレタン含有組成物は、硬化中に液状ビヒクル連続相が除去されて硬化または重合する際に、硬化したフィルム、層または膜を成形し、低分子蛋白に対しては予想外に充分な透過性を有し、比較的高分子の蛋白に対しては実質的に透過性を有しないフィルム、層または膜を提供することが分かった。ウレタン化合物は、連続相中に例えば乳化剤を含ませることにより溶解または分散させた後、いかなる公知の方法によっても硬化することができる。そのうえ、ウレタン化合物の溶液または分散液は、適当な硬化触媒を含むことができるか、あるいは、重合性ウレタン化合物の溶

7 3

含有組成物の成分として、完全に硬化していない形態で包含せしめる。重合性ウレタン化合物は、液状ビヒクル中に分散または溶解される。液状ビヒクルは、重合性ウレタン含有組成物の硬化の間に分散液または溶液から除去可能で、重合性ウレタン含有化合物が連続性のある層、フィルムまたは膜として乾燥及び硬化することを可能にする。硬化した層、フィルムまたは膜は、比較的小さな低分子蛋白の透過を思い掛けなくも可能にし、比較的大きな高分子蛋白を排除することを可能にする正確な孔径を有する。重合性ウレタンが基材のフィルム、層または膜は、したがって、ベンス・ジョーンズ蛋白の試験用に設計された乾式試薬試験細片のキャリヤーマトリックスとして機能するのに適している。液状ビヒクル連続相中に分散または溶解したウレタン化合物は、オリゴマー、プレポリマーまたは完全に硬化していないポリマーであることができる。重合性ウレタン含有組成物は、硬化に先立ち二指示試薬組成物と混合することができ、そして、二指示試薬組成物を含むキャ

7 2

液または分散液が、完全に硬化していない溶液または分散液の形態で層として塗布される限り、熱硬化することができる。一般に、本発明に従って有用であるウレタン化合物は、液状ビヒクル、例えばジメチルホルムアミドのような有機溶媒中に溶解または分散することができるウレタン化合物であり、溶解または分散した形態で重合性であり、硬化すると実質的に無色で連続したフィルム、層もしくは膜を与える。

本発明の一実施態様によると、重合性ウレタン化合物は、ウレタンプレポリマー、特に、プレポリマーの鎖の各端がイソシアネート官能基で終了する実質的に線状のウレタン単位から成るウレタンプレポリマーである。ウレタン化合物は、その性質において中性またはカチオン性であるか、あるいは、中性ウレタン化合物とカチオン性ウレタン化合物の組み合わせが使用できる。適当な市販ウレタンプレポリマーの例としては、DESMODERM KBH GRANULATE 及び DESMODERM KPK DISPERSIONがあり、双方とも BAYER AG社から市販

7 4

特開平 2-122264(20)

されている。

「ウレタンプレポリマー」という呼称は、ウレタンの繰返し単位から成る実質的に線状のポリマーを指すと理解される。ウレタンプレポリマーは、分子あたり少なくとも二つのイソシアネート官能基を有し、ポリウレタンプレポリマーは、少なくとも50,000の重量平均分子量(Mw)を有する。50,000未満、例えば約30,000の重量平均分子量のウレタンプレポリマーもまた、該プレポリマーが硬化時に連続フィルム、層または膜を成形する限り、有用である。最大Mwは、ウレタンプレポリマーが液状ビヒクルまたは連続相、例えばジメチルホルムアミドのような有機溶媒中に溶解または分散されるときMwである。完全に硬化していない分散ウレタンプレポリマーについては、約500,000までの重量平均分子量が本発明について実用的であると予測される。硬化すると、フィルム、層または膜の分子量に対しては上限がない。本発明の利点を最大に利用するには、重合性ウレタンプレポリマーのMwは、約70,000から約80,000

7 5

含有第3級アミンの反応により成形され、この反応では、ポリウレタンのアミン部はその後有機酸により中和され、続いて、この中和された重合ウレタンが水中に分散される。したがって、DESMODERM KPK は、アジピン酸、フタル酸及びエチレングリコール(Mw=1,700)のポリエステル200部；トルエンジイソシアネート50部；N-メチルジエタノールアミン20部；及びp-キシリレンジクロリド6部の反応生成物であるカチオン性の乳化剤を含まない重合ウレタン分散液である。

いずれにしても、本発明で利用されるウレタン化合物は、ウレタン含有組成物のその他の成分と混合した後に硬化し、低分子蛋白に対しては透過性を示し、比較的高分子量の蛋白に対しては不透過性を示す物理的構造及び電荷構造を有するフィルム、層または膜を与えなければならない。そのうえ、ウレタン含有組成物は、中性ウレタン化合物、カチオン性ウレタン化合物または中性ウレタン化合物とカチオン性ウレタン化合物の混合物のいずれかを含むことができる。ウレタン化合物

7 7

のMw範囲内であることが分かった。

本発明の方法において有用であるウレタン化合物、例えばウレタンプレポリマーは、イソシアネート含有モノマー、ヒドロキシル含有モノマー及び適当な第三のモノマー単位をウレタンプレポリマーに共重合させることによりウレタン化合物に組み込まれる他のモノマー単位を含ませることができる。同様に、本発明の方法において有用なポリウレタン化合物は、性質において中性(DESMODERM KBH)、アニオン性またはカチオン性(DESMODERM KPK)のいずれかであることができる。特にDESMODERM KBH は、エチレングリコール70モル%及び1,4-ブタンジオール(Mw=2,000)30モル%を含むアジピン酸のポリエステル75部；アジピン酸及び1,4-ブタンジオール(Mw=2,250)のポリエステル25部；1,4-ブタンジオール25部；及びジフェニルメタンジイソシアネート85部を反応させることにより得られる熱可塑性粒状重合ウレタン物質である。カチオン性ウレタンは、一般に、ポリイソシアネート、ポリオール及びヒドロキシル

7 6

は、ウレタン含有組成物中に、ウレタン含有組成物の総重量に基づいた約3重量%から約30重量%、好ましくは約5重量%から約20重量%の範囲内で存在する。

以下、より詳しく述べるとおり、ウレタン含有組成物に使用されるウレタン化合物の割合及びウレタン化合物の性質、つまり中性、カチオン性または中性/カチオン性の混合は、色の分解度、発色の安定性及び発色の速度に影響する。したがって、本発明の方法によると、ウレタンを基材としたキャリアマトリックスを含む被検体試験具は、必要に応じて、色分解度の改善、色安定性の増大または発色速度の増加を考慮して設計することができる。

重合性ウレタン化合物に加え、キャリアマトリックスを成形するために使用される重合性ウレタン含有組成物は、無機相が水不溶性の無機化合物、例えば硫酸バリウムを含む分散した無機相を含んでいる。

ウレタン含有化合物には、ウレタン含有組成物

7 8

特開平 2-122264(21)

の総重量に基づき、水不溶性無機化合物、例えば硫酸バリウム約15〜約40重量%、好ましくは約20〜約30重量%が充填剤として含まれている。充填剤として用いる無機化合物の厳密な種類は、該充填剤が白色であり、指示薬色素と蛋白との相互作用の際の色の検出及び測定に干渉しない限り、さらに無機充填剤が本質的に水不溶性であり、このため溶解したアニオン及び／またはカチオンが蛋白試験に対して化学的または物理的に干渉するよう作用しない限り、重要ではない。したがって、本発明の方法に従って用いられる水不溶性無機化合物には、硫酸カルシウム、二酸化チタン、アルミナ、酸化亜鉛、酸化マグネシウム、酸化カルシウム、二酸化珪素、タルク、酸化マグネシウムアルミニウム、酸化マグネシウムチタン、酸化バリウム、硫酸バリウム、硫酸ストロンチウム及びその他白色の水不溶性無機化合物、特に酸化物、またはそれらの混合物がある。

不溶性無機化合物がウレタン含有組成物に粉末として組み込まれ、該不溶性無機化合物が該ウレ

79

必ずしも特定のタイプに限定されず、アンモニウム、アルキルアンモニウム、カリウム及び／またはナトリウムドデシルベンゼンスルホネート、アルキルスルホネート、シリルアルキルスルホネート、硫酸アルキル、硫酸アルキルエーテル、ジオクチルスルホサクシネート、 α -オレフィンスルホネート及びアルキルサルコシネート、またはそれらの混合物がある。

さらに、他の界面活性剤、例えばジメチルポリシロキサン液のような珪素含有材料は、ウレタン含有組成物の総重量に基づいた2重量%までの範囲で該ウレタン含有組成物に組み込むことができる。これら珪素含有物質は、表面張力が低いことから、不溶性無機化合物の湿潤をさらに促進し、またウレタン含有組成物の表面張力を変化させ、レベリング効果を与えて平滑で「磨かれた」フィルム、層または膜を均一な厚さで与える。

先に述べたように、ウレタン含有組成物はまた、ウレタン化合物及び存在が考えられるいかなるアニオン性界面活性剤もしくは珪素含有物質を

81

タン含有組成物全体に亘って均一に分散することを確実にする。それに加え、不溶性無機化合物を粉末の形態で利用することにより、不溶性無機化合物は、硬化工程の間、ウレタン含有組成物全体に亘って均一に分散した状態に維持される。不溶性無機化合物の均一な分散により、その中に均一に分散した不溶性無機化合物を有する重合ウレタンを基材とするフィルム、層または膜が提供される。

重合性ウレタン含有組成物はまた、不溶性無機化合物を湿潤することを促進し、その結果不溶性無機化合物をウレタン含有組成物全体に均質に分散させることを助長するアニオン性界面活性剤を含むこともできる。アニオン性界面活性剤は、ウレタン含有組成物の総重量に基づいた0重量%から約5重量%までの範囲で存在することができる。アニオン性界面活性剤は、さらに、蛋白と二指示試薬組成物との接触の結果で発生する色を安定させるべく作用することができる。本発明の方法で有用であるとされるアニオン性界面活性剤は

80

も可溶化及び／または分散させることができる液状ビヒクル、例えば有機溶媒を含む。液状ビヒクルはまた、不溶性無機塩を分散させることができなくてはならない。有機溶媒は、ウレタン化合物と反応しないよう、比較的の不活性でなくてはならず、溶媒は、比較的低い温度で蒸発して乾燥ウレタンを基材とするフィルム、層または膜を提供しなければならない。有機非プロトン性溶媒、例えばジメチルホルムアミド、N-メチルピロリドン及びジメチルスルホキシドは、ウレタン含有組成物の成分を溶解及び分散するために必要な溶解力を提供し、溶媒とウレタン化合物との反応を阻止するために必要な不活性を提供し、溶媒を含まない重合ウレタンを基材とするフィルム、層または膜を提供するために必要な蒸気圧を有する。硬化中に除去された液状ビヒクルは、ウレタン含有組成物中に少なくとも30%の量で含まれ、好ましくは、重合性ウレタン含有組成物の総重量に基づいた少なくとも50重量%から約90重量%の量で存在する。

82

特開平 2-122264(22)

本発明の一実施態様に従い、重合性ウレタン含有組成物を実施例1で概説した処方に従って混合した。そして、実施例1のウレタン含有組成物A及びBを、同一の硬化工程に従って、ウレタンを基材とするフィルム、層または膜に変換した。

実施例1ウレタン含有組成物-A

DESMODERM KBH (中性ウレタン)	7.3 %
ナトリウムジオクチル	
スルホサクシネート	0.2 %
硫酸バリウム	22.0 %
ジメチルポリシロキサン液	1.4 %
ナトリウムドデシル	
ベンゼンスルホネート	1.4 %
DESMODERM KPK (カチオン性ウレタン)	10.0 %
ジメチルホルムアミド	57.7 %
合計	100.0 %

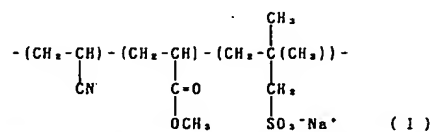
ウレタン含有組成物-B

DESMODERM KBH (中性ウレタン)	5.8 %
Dralon U	1.6 %
ナトリウムドデシル	
ベンゼンスルホネート	0.3 %
タルク	28.3 %
ジメチルポリシロキサン液	0.1 %
ジメチルホルムアミド	63.9 %

8 3

合計 100.0 %

Dralon Uは、構造式Iで示される一般構造を有する平均分子量が48,000のスルホン化ポリマーである。



実施例1の組成物A及び組成物Bの製造にあたっては、該組成物が均質になるまで、高速ミキサーを使用して各成分を徹底的に混合した。組成物AまたはBのいずれかをフィルム、層または膜に硬化させるため、該組成物を透明で不浸透性のプラスチックの支持体上に塗布した。塗布した組成物の厚さは、ドクターブレードを用いて約150 μ〜約750 μの湿潤厚さに調整した。プラスチックの支持体にウレタン含有組成物を塗布した後、該プラスチック支持体を約25〜約43℃の恒温に維持した循環水浴中に浸漬した。組成物を塗布した支持体を、30分から16時間の間、水浴に浸

8 5

8 4

漬することにより、ウレタン含有組成物を該水浴中で硬化させた。硬化後、フィルム、層または膜は、自然乾燥またはオープン乾燥させた。その後、先に説明したように、二指示試薬組成物のような試薬を、乾燥したフィルム、層または膜に含浸させた。他の方法として、二指示試薬組成物を特徴とする試薬がウレタン含有組成物の製造に使用される有機溶媒、例えばジメチルホルムアミド中に可溶性であり、さらに二指示試薬組成物を特徴とする試薬が水可溶性である場合、硬化に先立ち、該試薬をウレタン含有組成物中に組み込ませ、該ウレタン含有組成物を支持体に塗布した。

試験試料中の蛋白の量を検出及び測定するために二指示試薬組成物を使用することから生れた新規で思い掛けない結果を示し、さらに、特に試験試料中の低分子蛋白、例えばベンス・ジョーンズ蛋白の検出及び測定に関し、二指示試薬組成物をウレタンを基材とするフィルム、層または膜に組み込むことから生れた驚くべき結果を示すために、総蛋白試験ならびに濾紙の吸水性マトリック

8 6

特開平 2-122264(23)

スとウレタン基材のキャリアマトリックスに含浸した単一の指示薬を含む乾式試験細片及び二指示薬組成物を濾紙の吸水性マトリックスと重合ウレタン基材のキャリアマトリックスに含浸させることにより得られるベンス・ジョーンズ蛋白試験について、色空間プロットを作成した。

図1～4は、四つのアルブミン標準溶液及びベンス・ジョーンズ蛋白標準溶液と、濾紙または重合ウレタン基材のフィルム、層もしくは膜から成るキャリアマトリックスに含浸した単一指示薬色素あるいは二指示薬組成物のいずれかを含む種々の乾式試験細片とを接触させて得た色空間プロットである。

例えば、図1は、濾紙のキャリアマトリックスに含浸した単一指示薬であるテトラブロモフェノールブルー(TBPB)を含む乾式試験細片と、アルブミン0mg/dL(0)、アルブミン10mg/dL(10)、アルブミン50mg/dL(50)、アルブミン100mg/dL(100)及びベンス・ジョーンズ蛋白(BJ)100mg/dLを含む標準溶液とを接触させた結果から作

87

った軸、つまり L^* 、 A^* 、 B^* の各軸を含む。垂直軸上にプロットされた L^* の値は、色の強さの尺度であり、これによると大きな L^* の値は淡い色を示し、 $L^*=0$ であれば完全な黒色を表わす。水平の A^* 軸は、緑から赤への変色の尺度であり、これによると A^* の値がより正になるにつれ、より赤色に近くなり、同様に、 A^* の値がより負になるにつれ、より緑色に近くなる。同じく、第三の軸 B^* は、青から黄色への変色の尺度であり、これによると B^* の値が大きくなるにつれ、より黄色に近くなり、同様に、 B^* の値が小さくなるにつれ、より青色に近くなる。

色空間偏差(ΔE)は以下の方程式から計算される。

$$\Delta E = \sqrt{(L_1^* - L_2^*)^2 + (A_1^* - A_2^*)^2 + (B_1^* - B_2^*)^2}$$

方程式1

(式中、 L_1^* 、 A_1^* 及び B_1^* は、第一の標準蛋白溶液について決定した色空間値であり、

L_2^* 、 A_2^* 及び B_2^* は、第一の標準蛋白溶液とは異なる蛋白濃度を有する第二の標準蛋白溶液から

89

成した色空間プロットである。図2は、濾紙のキャリアマトリックスに含浸したテトラブロモフェノールブルー(TBPB)及びメチルオレンジ(MO)を含む二指示薬組成物を含む乾式試験細片を用いて、同じアルブミン及びベンス・ジョーンズ蛋白の標準溶液に接触させた結果から作成した色空間プロットである。同様に、図3は、標準蛋白溶液と、実施例1の組成物Aを硬化させることにより得られる重合ウレタンを基材とするフィルムに組み込んだ単一の指示薬であるテトラブロモフェノールブルー(TBPB)を含む乾式試験細片とを接触させることにより得られた色空間プロットである。図4は、標準蛋白溶液と、実施例1の組成物Bを硬化させることにより得られる重合ウレタンを基材とするフィルムに組み込んだテトラブロモフェノールブルー(TBPB)及びメチルオレンジ(MO)を含む二指示薬組成物を含む乾式試験細片とを接触させることにより得られた色空間プロットである。

図1～4に示すように、色空間プロットは、三

88

決定した色空間値であり、

ΔE は、第一及び第二の標準蛋白溶液の色空間プロット間の色空間偏差である)。

色空間偏差(ΔE)は、三次元色空間プロットにおける二点間の直線距離である。理論上は、「1」の色空間偏差は、肉眼で区別できる最小の色の偏差である。しかし、個人の視覚能力間の本来の差のために、色を実際に自信を持って区別するには約「5」の色空間偏差(ΔE)が要求される。

図1～4の色空間プロット上に記入した L^* 、 A^* 及び B^* の値は、400nm(ナノメートル)と700nmとの間で均等間隔を置いた16の異なる波長において採取した反射率測定値を基に、この分野では周知である標準的な方程式を用いて算出した。一般に、16の異なる波長のそれぞれにおける反射率にその波長における光度を掛けた。さらに、これらの値に、赤、緑及び青の各色についての標準重み関数を掛け、最後に合計した。これらの計算により三刺激値X、Y及びZが得られ、 L^* 、 A^* 及び B^*

90

特開平 2-122264(24)

は、X、Y及びZの三刺激値から以下の方程式を用いて算出した。

$$L^* = 116 X \{ (Y/Y_0)^{1/3} - 16 \} \quad (\text{方程式 2})$$

$$A^* = 500 X \{ (X/X_0)^{1/3} - (Y/Y_0)^{1/3} \} \quad (\text{方程式 3})$$

$$B^* = 200 X \{ (Y/Y_0)^{1/3} - (Z/Z_0)^{1/3} \} \quad (\text{方程式 4})$$

[式中、 X_0 、 Y_0 及び Z_0 は、完全な白色（すなわち、反射率＝全波長で100 %）の場合の三刺激値であり、X、Y及びZは、400nmと700nmの間の16の波長から上述のとおり算出した三刺激値である]

図1～4の色空間プロットから色空間偏差（ ΔE ）を算出し、表IIIに要約した。表IIIを解釈する際、 ΔE (Alb10-0) という表記は、アルブミン10mg/dLを含む蛋白溶液の蛋白試験とアルブミン0 mg/dLを含む蛋白溶液の蛋白試験との間での色空間偏差である。同様に、 ΔE (Alb50-0) という表記は、蛋白質50mg/dLを含む蛋白溶液の蛋白試験と蛋白0 mg/dLを含む蛋白溶液の蛋白試験

との間での色空間偏差である。 ΔE (Alb100-0) 及び ΔE (BJ100-0) という表記も同様に定義される。

9 1

9 2

表III
濾紙及び重合クレタ含有マトリックスにおける
色及び二指示試験システマについての色空間偏差 (ΔE)

番号	マトリックス	指示薬	ΔE (Alb10-0)	ΔE (Alb50-0)	ΔE (Alb100-0)	ΔE (BJ100-0)
1	濾紙	テトラプロモフェノール ブルー	4.8	19.2	25.5	4.4
2	濾紙	テトラプロモフェノール ブルー及びメチルオレンジ	9.1	22.0	30.2	12.2
3	クレタ含有組成物A	テトラプロモフェノール ブルー	3.2	9.8	20.5	28.3
4	クレタ含有組成物B	テトラプロモフェノール ブルー及びメチルオレンジ	7.1	21.6	30.4	48.9

0 = アルブミン0 mg/dL、ベンス・ジョーンズ蛋白0 mg/dL

Alb10 = アルブミン10mg/dL

Alb50 = アルブミン50mg/dL

Alb100 = アルブミン100 mg/dL

BJ100 = ベンス・ジョーンズ蛋白100 mg/dL

9 3

図1の色空間プロット及び表IIIにおいて例証したとおり、濾紙のキャリアマトリックスに含浸した単一の指示薬：テトラプロモフェノールブルーのみを有する乾式試験細片を用い、アルブミン及びベンス・ジョーンズ蛋白を含む標準溶液を対象に蛋白試験を実施した。図1及び表IIIより、アルブミン10mg/dLを含む溶液と、アルブミンを含まない溶液との間での色空間偏差は、4.8であると理解される。肉眼では通常約5の色空間偏差を有する色の間でしか識別できないことから、そのような試験では試料がアルブミンを含むかどうかについて結論を出すことができない。すなわちアルブミン0 mg/dLの溶液に接触している試験細片と、10mg/dLの試験細片に接触している試験細片との間の色の偏差が測定できないからである。測定者は、せいぜい、試料中には0 mg/dLから約10mg/dLのアルブミンが含まれると推測できる程度であった。

同様に、図1及び表IIIは、濾紙のマトリックスに含浸した単一色素を有する試験具により提供さ

9 4

特開平 2-122264(25)

れる色空間偏差が4.4、すなわち通常肉眼ではほとんど検出できない色空間偏差でしかないことから、測定者が、ベンス・ジョーンズ蛋白を0 mg/dL から約100 mg/dL 含んだ試験試料中のベンス・ジョーンズ蛋白の濃度を測定できなかったことを示している。表Ⅲ及び図1は、さらに、色空間偏差がそれぞれ19.2と25.5であることから、50 mg/dL ~100 mg/dL のアルブミンの存在の結果である色の偏差を検出することができることを示す。

しかし、驚くべきことであり、思い掛けないことであるが、濾紙のマトリックスを本発明の二指示試薬組成物で含浸することにより、測定者はアルブミン0 mg/dL を含む試料とアルブミン10 mg/dL を含む試料とを視覚的に識別することができた。図2及び表Ⅲから、アルブミン10mg/dL を含む溶液とアルブミンを含まない溶液との間の色空間偏差 (ΔE) は、テトラプロモフェノールブルー及びメチルオレンジを含む二指示試薬組成物を使用した場合、9.1であった。この程度の色空

9 5

別には不十分である。しかし、図3の色空間偏差が、濾紙のマトリックスを使用した図1における ΔE 4.4 に対して、29.3に増加するにつれ、重合ウレタンを基材としたフィルムマトリックスは、ベンス・ジョーンズ蛋白に関して劇的に増大した感度を提供したことは驚くべきことである。

予測できないことだが、ベンス・ジョーンズ蛋白試験に関しては、一段と感度が増大することが図4において分かった。図4の場合では、二指示試薬組成物が重合ウレタンを基材としたフィルムマトリックスに組み込まれていた。図3に比較すると、色空間指数は29.3から48.9に増加し、色の分解度及びベンス・ジョーンズ蛋白に対する感度において予測できない向上が見られた。図4は、さらに、アルブミン10mg/dL を含んだ溶液について ΔE 値が、単一の指示薬色素を用いた図4における視覚的に認知不可能な ΔE 値である3.2 に対し、視覚的に認知可能な値の7.1 にまで増加したことから、重合ウレタンを基材とするフィルムマトリックスに組み込んだ二指示試薬組成物をアル

9 7

間偏差は肉眼で認識するには充分であり、図1の単一指示薬色素により得られる4.1 の色空間偏差に比べ本質的な向上を示す。同様に、ベンス・ジョーンズ蛋白100 mg/dL の溶液とベンス・ジョーンズ蛋白0 mg/dL の溶液との間の色空間偏差が12.2であることから、測定者は、試験試料中のベンス・ジョーンズ蛋白を視覚的に検出することができた。この程度の色の偏差は、肉眼による色の識別を可能にするには充分である。同様に、表Ⅲ及び図2は、アルブミンを含まない溶液に比較し、アルブミン50mg/dL 及び100 mg/dL を含む溶液についての色の識別の改善を示す。

図3に関しては、重合ウレタンを基材としたフィルム、屈またはマトリックスに含浸させた単一指示薬色素では、試験試料中の低い値のアルブミンの有無及び濃度を測定する方法は提供されなかったことが実証された。アルブミン10mg/dL を含んだ溶液については、アルブミン0 mg/dL を含んだ対照溶液との間での色空間偏差 (ΔE) は3.2 にすぎなかった。この色空間偏差では、肉眼での鑑

9 6

別は、アルブミンの試験に使用する利点を示している。

全般的には、図1~4及び表Ⅲは、濾紙のマトリックスまたは重合ウレタンを基材としたフィルムマトリックスに含浸させた二指示試薬組成物が、液体試験試料中の蛋白総含有量、特に30 mg/dL 未満の低蛋白値の試験において色の分解度及び試験感度を改善することを示している。本発明の方法及び組成物により、試薬含有キャリアマトリックスと蛋白を0 mg/dL から10mg/dL の間の値で含んだ試験試料との接触の結果である変色を視覚的に識別することができ、このためより正確で信頼性の高い試験が提供された。本発明は、さらに、分析の妨害となる高分子蛋白を本質的に除去するキャリアマトリックスを提供することにより、そして低濃度の低分子蛋白の検出及び測定を可能とするに充分な感度を有する試薬組成物を提供することにより、試験試料中のベンス・ジョーンズ蛋白及びその他の低分子蛋白について迅速かつ正確に試験する方法を提供した。

二指示試薬組成物を用いると、キャリアマト

9 8

特開平 2-122264(26)

リックスが濾紙であるか、重合ウレタンを基材とするフィルム、マトリックス、膜または層であるかに係わらず、色の差異が強調されることが実証された。さらに、重合ウレタンを基材としたフィルムマトリックスにおいて二指示試薬組成物を用いることにより、低分子蛋白に対する感度の劇的な増大が見られ、その結果、低分子蛋白の試験に対して簡易な乾式試験細片手法が提供された。図1～4及び表Ⅲにおいて実証したとおり、ベンス・ジョーンズ蛋白100 mg/dLを含んだ溶液を濾紙のマトリックスに組み込んだ単一の指示薬色素を用いて試験した場合、ベンス・ジョーンズ蛋白を含まない溶液の試験と比較して、感知不可能な色偏差である4.4が得られた。しかし、色の分解度及び試験感度は、該単一色素を重合ウレタン含有のマトリックスに組み込むことで改良され、これにより色偏差は容易に感知可能な値である29.3となった。そのうえ、重合ウレタンを基材とするフィルムマトリックスに組み込んだ二指示試薬組成物を使用すると、さらに、色偏差が48.9という

9 9

は組成物Bのいずれかを硬化させることによって得られる膜、層またはフィルムには長所及び短所がある。例えば、実施例1の組成物Aを硬化させることによって得られる膜またはフィルムは、試験試料が膜から拭き取られて乾燥した後でも、優れた色の識別及び優れた色の安定性を提供する。例えば、実施例1の組成物Aを硬化させることによって得られる膜またはフィルムを用いた被検体試験具については、アルブミンまたはベンス・ジョーンズ蛋白との接触の結果である変色は、数日間にわたって色の強さまたは深さにおいて目に見える劣化は示さなかった。しかし、組成物Aから得られたフィルムの色の発色は遅く、したがって、このフィルムは、通常の含浸／脱取りの形態で使用される場合、制限を受けるかもしれない。その結果、組成物Aから得られたフィルムマトリックスを使用した場合、ピベットを使って試験試料をフィルムマトリックス上に移し、約2分間フィルムマトリックスと接触させた。そして、アルブミンとの接触に反応して発生した色を、視覚

1 0 1

思い掛けない値にまで増加するほど、色分解度及び試験感度が劇的に向上した。

低分子蛋白の試験において重合ウレタンを基材としたフィルム、層または膜を二指示試薬組成物のキャリアマトリックスとして使用することに関しては、すべてのウレタン基材のフィルムマトリックスが蛋白含有溶液との接触に同等に反応するわけではなく、したがって、いくつかのウレタン基材のマトリックスは、高いブランク色の発生度、蛋白値間での色の識別の不充分さ及び／または水性相への色の浸出が理由で、不適当であることが分かった。実施例1の組成物A及び組成物Bを硬化させることにより得られる重合ウレタンを基材とする二つのマトリックスは、これらの欠点を示さず、したがって好ましいことが示された。しかし、組成物A及びBは、良好な蛋白測定を行なうために本発明の方法に従ってマトリックスとして用いることができる唯一の組成物でないことは強調されるべきである。

それにもかかわらず、実施例1の組成物Aまた

1 0 0

または機器を使用して、また、試験試料がマトリックスと接触したままの状態または試料がマトリックスから拭き取られた後で測定した。

実施例1の組成物Bを硬化させることによって得られたウレタンを基材としたフィルムマトリックスもまた、非常に良好な色分解度及び識別を提供した。しかし、実施例1の組成物Aを硬化させて成形したキャリアマトリックスと異なり、実施例1の組成物Bを硬化させることによって得られたフィルムマトリックス上の色の発色は速く、したがって、このフィルムマトリックスは、アルブミンの試験において通常の含浸／脱取り形式で 사용할ことができた。しかし、ベンス・ジョーンズ蛋白の試験においては色の発色は遅く、発色が完了するには2分間が必要であった。したがって、変色を起こさせるには、試験細片を比較的長時間、尿試料中に含浸したままにしなければならぬであろう。この欠点を克服するには、尿試料を試験パッド上にピベットで移し、応答の有無について試験細片を検査する前に2分間

1 0 2

特開平 2-122264(27)

の反応時間を置く。そのうえ、試料をマトリックスから拭き取った後、含有蛋白に反応して発生した色は褪せ始め、このため、変色の程度及び深さは、液体試験試料を試験細片から除去した直後に測定しなければならない。

したがって、本発明の重要な特徴によると、尿またはその他の液体試験試料中の蛋白総含有量または低分子蛋白含有量のより正確でより信頼性が高い試験を二指示薬組成物を用いて実施することができる。二指示薬組成物は、試験の色分解度を改善し、したがって、試験の感度、特に約 30 mg/dL 及びそれ以下の低いアルブミン値での感度を改善する。さらに、重合ウレタンを基材とする膜、フィルムまたは箔を二指示薬組成物のキャリアマトリックスとして含む乾式試験細片を用いて試験を実施することにより、試験試料中の低分子蛋白、例えばベンス・ジョーンズ蛋白の有無及び／または濃度を測定する新規で思い掛けないほど正確な方法が提供される。

本発明の精神及び範囲に反することなく、以上

103

ノールブルー (TBPB) を組み込んだ重合ウレタン含有フィルムから成るキャリアマトリックスを含む乾式試験細片を使用した場合の、アルブミンをそれぞれ 0、10、50 及び 100 mg/dL 含む液体試料ならびにベンス・ジョーンズ蛋白 100 mg/dL を含む液体試料の試験を示す色空間プロットであり；そして

図 4 は、二指示薬色素、テトラブロモフェノールブルー (TBPB) 及びメチルオレンジ (MO) を組み込んだ重合ウレタン含有フィルムから成るキャリアマトリックスを含む乾式試験細片を使用した場合の、アルブミンをそれぞれ 0、10、50 及び 100 mg/dL 含む液体試料ならびにベンス・ジョーンズ蛋白 100 mg/dL を含む液体試料の試験を示す色空間プロットである。

105

に述べた本発明の数多くの修正及び変更を構成することができることは明らかであり、したがって、添付の特許請求の範囲に明記したような限定以外は課されるものではない。

4. 図面の簡単な説明

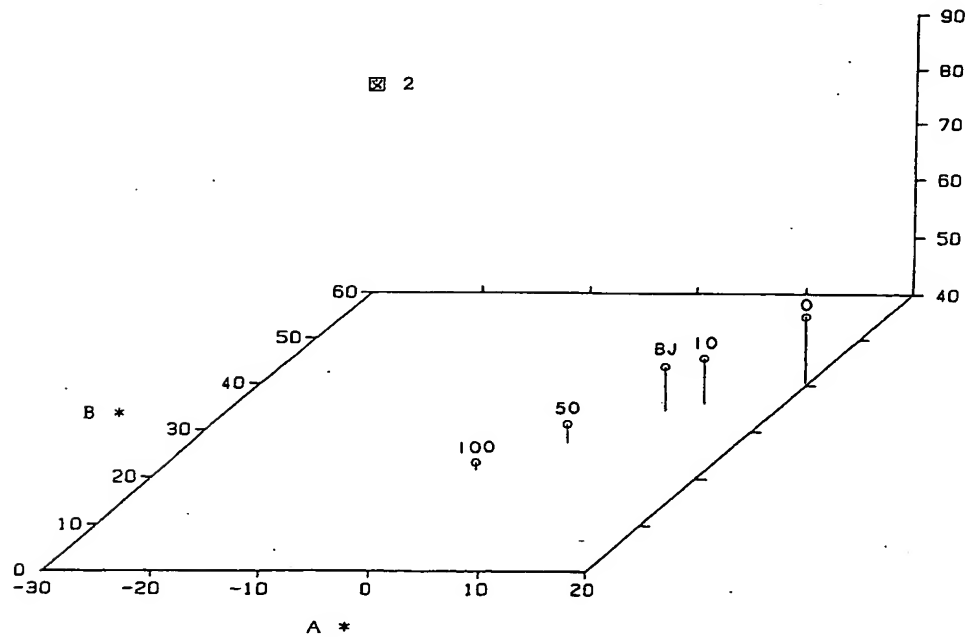
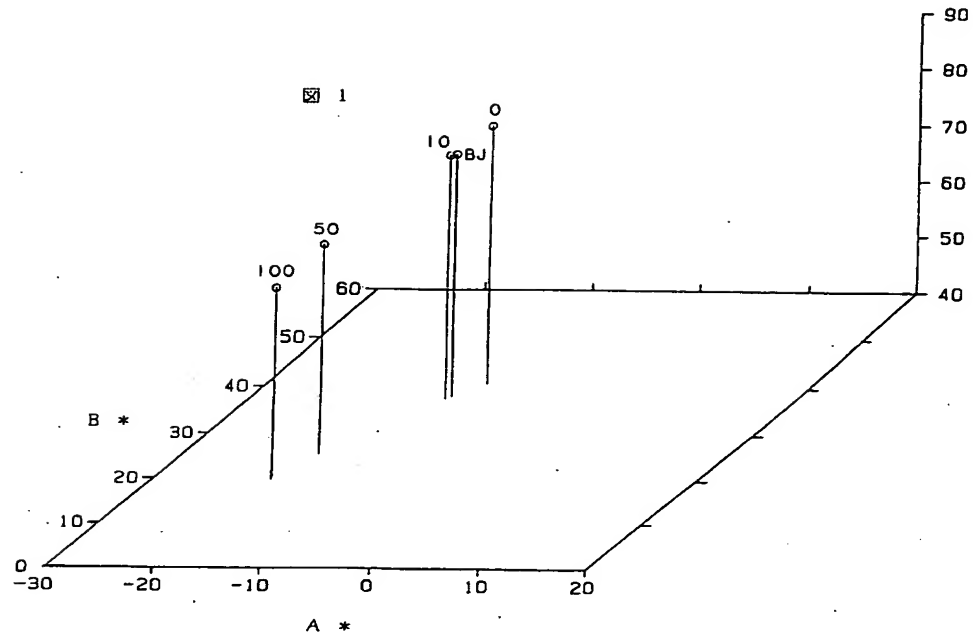
図 1 は、単一の指示薬色素、テトラブロモフェノールブルー (TBPB) を組み込んだ濾紙の吸水性マトリックスをから成る乾式試験細片を使用した場合の、アルブミンをそれぞれ 0、10、50 及び 100 mg/dL 含む液体試料ならびにベンス・ジョーンズ蛋白 100 mg/dL を含む液体試料の試験を示す色空間プロットであり；

図 2 は、二指示薬色素、テトラブロモフェノールブルー (TBPB) 及びメチルオレンジ (MO) を組み込んだ濾紙の吸水性マトリックスから成る乾式試験細片を使用した場合の、アルブミンをそれぞれ 0、10、50 及び 100 mg/dL 含む液体試料ならびにベンス・ジョーンズ蛋白 100 mg/dL を含む液体試料の試験を示す色空間プロットであり；

図 3 は、単一の指示薬色素、テトラブロモフェ

104

特開平 2 - 122264 (28)



特開平 2 - 122264 (29)

